

Aus der Medizinischen Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zum differenzierten
Wirkungsprofil von Glucocorticoiden in
humanen mononukleären Zellen des
peripheren Blutes**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Lydia Naumann
aus Radebeul

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Straub
2. PD Dr. med. G. Kayser
3. Prof. Dr. med. F. Buttgereit

Datum der Promotion: 14.02.2005

Abstract

Qualitativ unterschiedliche genomische und nichtgenomische Mechanismen vermitteln die starken anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften der Glucocorticoide (GC). Der genomisch vermittelte Mechanismus ist bereits gut untersucht und dokumentiert, während der nichtgenomisch vermittelte Mechanismen noch einen Gegenstand vielseitiger Untersuchungen darstellt. Wir haben uns daher die Frage gestellt, ob Beclometason und Clobetasol besonders geeignet für die topische Applikation sind, weil sie sich in ihrem Wirkungsspektrum von systemisch zu applizierenden GC wie Dexamethason unterscheiden. Wir verglichen dazu die Effekte auf den Sauerstoffverbrauch mittels der Clark-Elektrode (nichtspezifisch nichtgenomischer Mechanismus), auf die IL-6-Synthese mittels ELISA (genomischer Mechanismus) und auf die Apoptose mittels Durchflusszytometrie (nichtgenomischer und genomischer Mechanismus) in ruhenden und stimulierten humanen PBMC. Dabei zeigten Beclometason und Clobetasol in sehr niedrigen Konzentrationen (10^{-10} , 10^{-8} M) einen stärkeren Effekt auf den Sauerstoffverbrauch, waren aber in hohen Konzentrationen (10^{-5} , 10^{-4} M) weniger potent im Vergleich zu Dexamethason. Auch hinsichtlich ihrer genomischen Potenz waren die topischen GC in einer Konzentration von 10^{-10} M und 10^{-8} M effektiver als Dexamethason, in höheren Konzentrationen unterschieden sie sich aber nicht. Alle drei GC induzierten Apoptose konzentrationsabhängig und unterschieden sich nicht in Konzentrationen zwischen 10^{-8} M und 10^{-5} M. In einer Konzentration von 10^{-4} M war die Induktion von Apoptose durch die topischen GC in PBMC und Jurkat-T-Zellen aber signifikant stärker im Vergleich zu Dexamethason. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich topische und systemische GC in ihrer genomischen und nichtgenomischen Potenz signifikant unterscheiden. Es ist daher davon auszugehen, dass nichtgenomische Effekte eine deutlichere klinische Relevanz besitzen als bisher angenommen.

Genomische und nichtgenomische Glucocorticoid-Effekte
systemische und topische Glucocorticoide
humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
Apoptose
Interleukin-6
Sauerstoffverbrauch

Abstract

Several different genomic and non-genomic mechanisms mediate the important anti-inflammatory and immunomodulatory effects of glucocorticoids (GCs). The genomic effects are the most important while the clinical relevance of non-genomic actions is still a matter of debate. We therefore investigated whether beclomethasone and clobetasol are particularly suitable for topical application because they differ in their spectrum of activity from systemically administered GCs such as dexamethasone. We compared effects on oxygen consumption as measured with a Clark electrode (nonspecific non-genomic glucocorticoid effects), on interleukin-6 synthesis by means of ELISA (genomic effects) and on apoptosis using flow cytometry (non-genomic and genomic effects) in quiescent and mitogen-stimulated PBMCs. Beclomethasone and clobetasol had stronger effects on the oxygen consumption of quiescent and stimulated cells at lower concentrations (10^{-10} , 10^{-8} M) but were less potent at higher concentrations (10^{-5} , 10^{-4} M) in comparison with dexamethasone. Also in terms of genomic potency, topical GCs were more effective than dexamethasone at 10^{-10} M and 10^{-8} M but gave similar results at higher concentrations. The ability of all three GCs to induce apoptosis was found to be concentration-dependent and similar at concentrations between 10^{-8} and 10^{-5} M but, compared with 10^{-4} M dexamethasone, 10^{-4} M beclomethasone or clobetasol was significantly more effective at inducing apoptosis in both PBMCs and Jurkat T cells. These results show that systemic and topical GCs differ significantly in their ability to induce genomic and non-genomic effects. This suggests that non-genomic effects are more therapeutically relevant in certain clinical conditions than currently assumed.

genomic and non-genomic glucocorticoid effects

systemic and topical glucocorticoids

human peripheral blood mononuclear cells

apoptosis

interleukin-6

oxygen consumption

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AK	Antikörper
aSMase	saure Sphingomyelinase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Con A	Concanavalin A
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERK	Extrazellulär-Signal-regulierte Kinase
FCS	fetales Kälberserum
GR/hGR α	humaner Glucocorticoidrezeptor α
cGR	zytosolischer Glucocorticoidrezeptor
mGR	membranständiger Glucocorticoidrezeptor
h	Stunde
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltriphosphat
JNK	c-Jun NH ₂ -terminale Proteinkinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
min	Minute
MW	Mittelwert
NF- κ B	nuclear factor κ B
PÄ	Prednisolonäquivalent
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂

PLC	Phospholipase C
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
S.E.M.	Standardabweichung der Mittelwerte
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	9
1.1 Modulare Wirkungsmechanismen von Glucocorticoiden.....	10
1.2 Struktur-Wirkungsbeziehung von Glucocorticoiden	17
1.3 Bisherige Untersuchungen zu Wirkungsprofilen von Glucocorticoiden	20
1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	21
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Präparation humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes mittels Dichtegradientenzentrifugation	23
2.1.1 Isolierung und <i>in vitro</i> -Inkubation von PBMC zur Messung des Sauerstoffverbrauchs	23
2.1.2 Präparation, Zellkultur und <i>in vitro</i> -Inkubation von PBMC zur Messung der IL-6-Synthese und Apoptose.....	25
2.1.3 Zellkultur von Jurkat-Zellen	26
2.2 Amperometrische Quantifizierung des zellulären Sauerstoffverbrauchs.....	26
2.2.1 Prinzip.....	26
2.2.2 Versuchsdurchführung.....	28
2.3 Nichtkompetitiver ELISA zur Quantifizierung der IL-6-Synthese.....	30
2.3.1 Prinzip.....	30
2.3.2 Durchführung.....	31
2.4 Durchflusszytometrie (FACS) zur Quantifizierung von Apoptose.....	33
2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie	33
2.4.2 Nachweis apoptotischer Zellen mittels Annexin V-FITC	33
2.4.3 Nachweis apoptotischer Zellen mittels DNA-Färbung.....	35
2.4.4 CD95-exprimierende humane Jurkat-Zelllinie	37
2.5 Statistische Auswertungen	38
2.5.1 Deskriptive Statistik.....	38
2.5.2 Parametrische und nichtparametrische Tests.....	38
3. ERGEBNISSE.....	40
3.1 Untersuchungen zum zellulären Energiestoffwechsel mittels Clark-Elektrode.....	40
3.1.1 Sauerstoffverbrauch von ruhenden und stimulierten PBMC	40

3.1.2	Effekte von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol auf den Sauerstoffverbrauch von ruhenden PBMC	41
3.1.3	Effekte von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol auf den Sauerstoffverbrauch von stimulierten PBMC	44
3.1.4	Effekte der Con A-Stimulation auf den Sauerstoffverbrauch von humanen PBMC nach Vorinkubation mit Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol.....	47
3.1.5	Zusammenfassung	50
3.2	Quantitative Bestimmung von IL-6 mittels nichtkompetitivem ELISA	53
3.2.1	IL-6-Synthese von ruhenden und stimulierten PBMC	53
3.2.2	Effekte von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol auf die IL-6- Synthese von ruhenden PBMC.....	54
3.2.3	Effekte von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol auf die IL-6-Synthese von PHA-stimulierten PBMC	56
3.2.4	Effekte von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol auf die IL-6-Synthese von Con A-stimulierten PBMC.....	59
3.2.5	Zusammenfassung	62
3.3	Quantitative Bestimmung von Apoptose mittels Durchflusszytometrie (FACS)	65
3.3.1	Standardisierungsbedingungen	65
3.3.2	Effekte von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason auf die Apoptose von Jurkat-Zellen.....	69
3.3.3	Effekte von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol auf die Apoptose von PBMC	70
4.	DISKUSSION	75
4.1	Grundlagen der Glucocorticoidtherapie	75
4.2	Modulares Modell der Wirkmechanismen von Glucocorticoiden	79
4.2.1	Unspezifisch nichtgenomischer Mechanismus	79
4.2.2	Genomischer Mechanismus	87
4.2.3	Apoptose als komplexer, trimodular vermittelter Prozess.....	93
4.2.4	Nichtgenomische und genomische Potenzen für Clobetasol und Beclomethason im Vergleich zu Dexamethason und klinische Relevanz	98
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	102
6.	LITERATURVERZEICHNIS	104

1. Einleitung

Glucocorticoide sind seit ihrer erstmaligen klinischen Anwendung 1948 durch Philip S. Hench zu einem unverzichtbaren Bestandteil der medikamentösen Therapie in der modernen Medizin geworden ([Hench et al. 1949](#)). Cortison als physiologisches Steroidhormon der Nebennierenrinde (Zona fasciculata und reticularis) wurde 1936 von E.C. Kendall, O. Wintersteiner und T. Reichstein unabhängig voneinander entdeckt und konnte ab 1948 vollständig synthetisiert werden ([Kaiser et al. 1988](#)).

Physiologisch vermitteln Glucocorticoide wichtige Wirkungen im Glucose-, Lipid- und Proteinstoffwechsel. Sie spielen eine bedeutende Rolle bei Prozessen der Zelldifferenzierung, der Regulation von Wachstum und Apoptose ([Planey et al. 2000](#), [King et al. 1998](#)) und stellen über einen negativen Rückkopplungsmechanismus einen wichtigen neuroendokrinen Regulationsfaktor für Immunfunktion und Stress dar ([Webster et al. 2002](#), [Sapolsky 2000](#)).

Therapeutisch haben Eigenschaften wie ausgeprägte antiinflammatorische, immunsuppressive, antiödematöse, zytostatische und antiallergische Wirkungen zu ihrem Einsatz in fast allen medizinischen Fachgebieten geführt ([Morand 2000](#), [Hatz 1998](#), [Kaiser et al. 1997](#)). Sie dienen sowohl als Notfallmedikamente bei lebensbedrohlichen Zuständen wie beispielsweise beim Status asthmaticus als auch als Langzeittherapeutika wie bei der Rheumatoiden Arthritis.

Glucocorticoide werden in unterschiedlichen Dosierungen in Abhängigkeit von der Indikation eingesetzt ([Buttgereit et al. 2002](#)). Gute klinische Effekte erreichen systemisch applizierte Glucocorticoide als low-dose-Therapie bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen, die einer Langzeittherapie bedürfen. Glucocorticoide werden dabei in sehr niedrigen Dosen (≤ 5 mg Prednisolonäquivalent (PÄ)/Tag) als gerade noch wirksame Erhaltungsdosis u.a. zur Behandlung der Rheumatoiden Arthritis und des Asthma bronchiale angewandt ([Kirwan 2001](#), [Umland et al. 2002](#)). Niedrige Dosen ($\leq 7,5$ mg PÄ/Tag) werden zur Erhaltungstherapie bei rheumatischen Erkrankungen verwendet, ohne dabei unvertretbar viel unerwünschte Nebenwirkungen hervorzurufen ([da Silva et al. 2000](#), [Klippel 1998](#)). Mittlere Dosen ($> 7,5$ mg bis ≤ 30 mg PÄ/Tag) dienen z. B. der Therapie der Rheumatoiden Arthritis, der Polymyalgia rheumatica, des Asthma bronchiale oder des subakuten Hirnödems ([Li et al. 2000](#), [Meinig et al. 1990](#), [Kaiser 1991](#)). Bei subakuten und akuten Krankheiten und speziell bei lebensbedrohlichen Verläufen werden Glucocorticoide über einen kurzen Zeitraum (3-5 Tage) in hohen (> 30 mg bis ≤ 100 mg PÄ/Tag) und sehr hohen Dosen (> 100 mg PÄ/Tag), speziell als hochdosierte intravenöse Stoßtherapie (≥ 250 mg PÄ/Tag), gegeben. Hauptindikationen hierfür sind

Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen ([Volpin et al. 2002](#)), akute Schübe der Multiplen Sklerose ([Brusaferri et al. 2000](#)), der Rheumatoiden Arthritis, von Kollagenosen und generalisierten Vaskulitiden ([Langford 2001](#), [Navarette et al. 2000](#), [Youssef et al. 1997](#)), schwere akute Asthmaanfälle bzw. Schädel-Hirn-/Rückenmarkstraumata ([Hall 2001](#), [Bracken et al. 1992](#)).

Trotz der intensivierten Forschung zur Aufklärung der Wirkmechanismen der Glucocorticoide in den letzten Jahren werden die Risiken einer Glucocorticoidtherapie noch nicht genügend beherrscht. Unerwünschte systemische Wirkungen wie die Symptomatik des Hyperkortizismus ([Ferrari 2003](#)) oder die glucocorticoid-induzierte Osteoporose ([Patschan et al. 2001](#)) stehen ihrem weitverbreiteten Einsatz gegenüber. Viele Einzelwirkungen konnten erforscht werden, ohne dass sich ein endgültiges Gesamtkonzept der Wirkungsmechanismen der Glucocorticoide etablieren ließ ([Buttgereit et al. 1996](#), [Goulding et al. 1993](#)). Auch heute noch lässt sich dieses Gesamtkonzept nur als Hypothese formulieren ([Buttgereit et al. 1998](#)).

1.1 Modulare Wirkungsmechanismen von Glucocorticoiden

Buttgereit et al. fassten die Erkenntnisse über den modularen Wirkungsmechanismus von Glucocorticoiden als Hypothese zusammen ([Buttgereit et al. 1998](#)). Es wird davon ausgegangen, dass Glucocorticoide ihre therapeutischen Effekte über drei *qualitativ unterschiedliche Mechanismen* vermitteln ([Buttgereit et al. 1998](#), [Wehling et al. 1997](#)):

- *Genomisch (Modul I)*
- *Spezifisch nichtgenomisch (Modul II)*
- *Unspezifisch nichtgenomisch (Modul III).*

Genomische, über einen ubiquitären, zytosolischen Rezeptor vermittelte Wirkungen treten bereits bei sehr niedrigen Dosen auf ($< 10^{-12}$ M). Bei Dosissteigerung nehmen die genomischen Wirkungen durch verstärkte Rezeptorauslastung quantitativ zu, allerdings nur bis zu einem Maximum, dass bei einer Dosis von etwa 200-300 mg PÄ pro Tag liegt. Nach Applikation dieser Dosis ist der Sättigungsbereich zytosolischer Rezeptoren für Glucocorticoide erreicht ([Tyrrell 1995](#)). Der zusätzliche therapeutische Nutzen bei weiterer Dosissteigerung in entsprechenden

klinischen Situationen kann daher nur über zusätzlich zur Verfügung stehende, *nichtgenomische* Mechanismen erzeugt werden.

Man geht zum einen davon aus, dass Glucocorticoide bei Dosen $> 10^{-9}$ M über einen membranständigen Glucocorticoidrezeptor spezifisch nichtgenomische Effekte vermitteln. Bei sehr hohen Dosen ($> 10^{-5}$ M) kommt es zusätzlich über eine Interkalierung der Glucocorticoide in die Zellmembran zu unspezifisch nichtgenomischen Effekten. Abbildung 1 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die drei modularen Mechanismen der Glucocorticoidwirkungen.

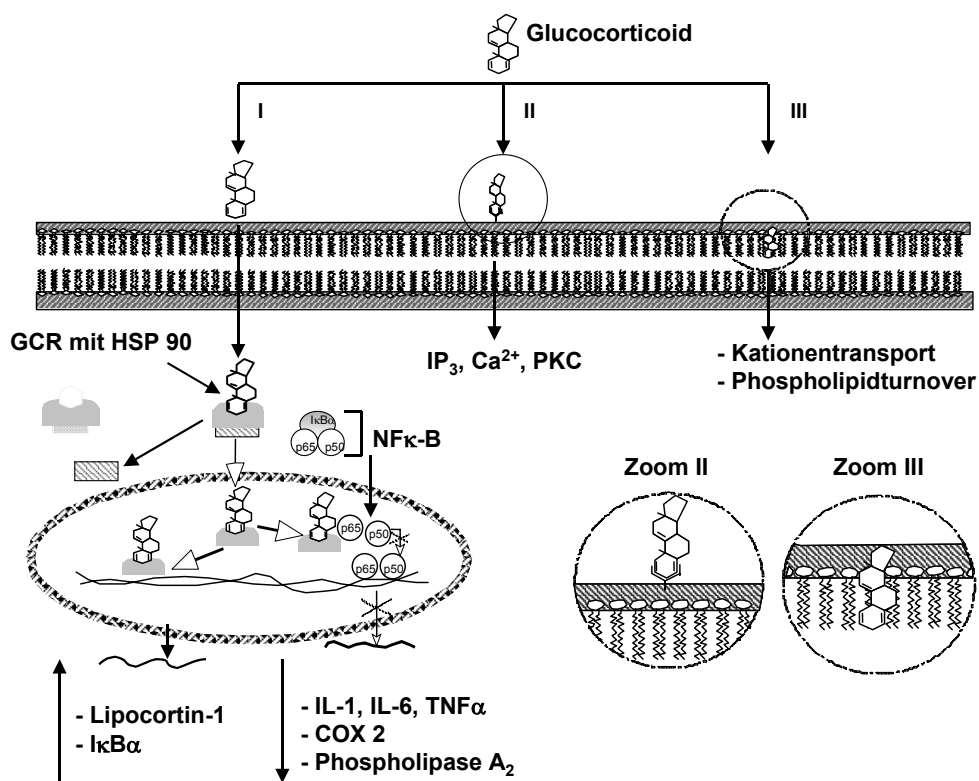


Abb. 1: Modulares Konzept der zellulären Glucocorticoidwirkungen nach Buttgerit et al. 1998. Genomischer (I), spezifisch nichtgenomischer (II) und unspezifisch nichtgenomischer (III) Wirkmechanismus; HSP: heat-shock-protein; IP₃: Inositoltriphosphat; PKC: Proteinkinase C; NF-κB: nuclear factor κB; IL: Interleukin; TNF: Tumornekrosefaktor; COX: Cyclooxygenase

Genomische Wirkungen (Modul I)

Munck et al. entdeckten 1968 erstmals zytoplasmatische Glucocorticoidrezeptoren (cGR) in Rattenthymozyten ([Munck et al. 1968](#)). 1985 konnten Hollenberg et al. die Glucocorticoidrezeptor-cDNA klonieren ([Hollenberg et al. 1985](#)). Seit 1991 ist die Struktur des zytosolischen Glucocorticoidrezeptors α (cGR α) bekannt ([Encio et al. 1991](#)).

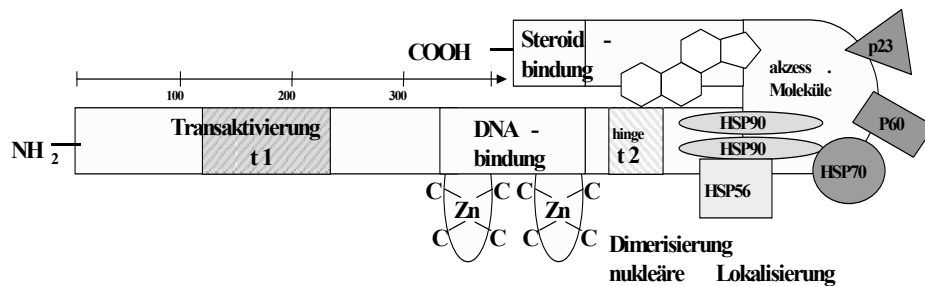


Abb. 2: Intrazellulärer Glucocorticoidrezeptor α . ([Berki et al. 1998](#), [deRijk et al. 2002](#))

Bisher wurde nur ein Glucocorticoidrezeptorgen nachgewiesen (Chromosom 5q11-q13; [Hollenberg et al. 1985](#)). Es sind aber mehrere Proteinisoformen bekannt ([Yudt et al. 2002](#)). Zwei Isoformen werden mit α und β bezeichnet. Der cGR α (777 Aminosäuren) stellt die biologisch aktive Form dar. Er weist im Wesentlichen drei Regionen auf: An das carboxyterminale Ende bindet das Glucocorticoid (Ligandbindungsdomäne), die mittlere Region dient als Bindungsstelle für die DNA im Zellkern, das aminoternale Ende ist spezieabhängig verschieden, hat eine stark antigene Potenz und nimmt eventuell Einfluss auf andere hormonsensitive Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma. Der cGR β (742 Aminosäuren) kann keine Glucocorticoide binden und nicht die Transkription beeinflussen. Trotzdem wird er in allen glucocorticoid-sensitiven Geweben gefunden. Eine eigenständige Funktion ist bis jetzt nicht bekannt ([Yudt et al. 2001](#)). Er stellt wahrscheinlich eine dominant negative Antagonisierungsform von cGR α dar ([Oakley et al. 1999](#), [Bamberger et al. 1995](#)).

Die über den cGR vermittelte genomische Beeinflussung der Transkription tritt nach einer zeitlichen Latenz von frühestens 30 Minuten nach Rezeptorbindung auf und erreicht ihr Maximum nach 6 bis 8 Stunden, wobei der Wirkungseintritt vom Zellzyklus abhängt. Zu den am frühesten beobachteten cGR vermittelten transkriptionsabhängigen Wirkungen zählt die von Groner et al. beschriebene, 7,5 Minuten nach Glucocorticoid-Applikation aufgetretene Transkriptionsinitiation im Mausmodell (L tk-aprt-Zellen, [Groner et al. 1983](#)). Der Nachweis der

Spezifität genomischer Effekte erfolgt über die Antagonisierung mit RU486, einem Steroidrezeptorblocker mit hoher Spezifität für den GR ([Bamberger et al. 1995](#)).

Der Mechanismus der *cGR* vermittelten *transkriptionsabhängigen Effekte* ist auf molekularer Ebene weitgehend aufgeklärt. Die Modulation glucocorticoid-sensitiver Gene wird über den cGR α realisiert, der über eine Komplexbindung mit Chaperon-Molekülen (zwei Hitzeschockproteine Hsp70 und Hsp90 und ein Immunophilin Ip56) verbunden ist. Er wird zu den nukleären Transkriptionsfaktoren gezählt. Jede Zelle enthält ca. 3000-100000 dieser Rezeptoren. Als lipophile Substanzen sind Glucocorticoide in der Lage, Biomembranen durch Diffusion zu passieren. Ihre Bindung an den zytosolischen Rezeptor führt zur Dissoziation der Chaperon-Moleküle, wodurch die DNA-Bindungsstelle frei wird. Der Steroid-Rezeptor-Komplex dimerisiert und kann in dieser aktivierten Form nach seiner Translokation in den Zellkern direkt an sogenannte „glucocorticoid responsive elements“ (GRE) - spezifische kurze DNA-Sequenzen des Zielgens – binden und damit in der Promoterregion die Transkription des entsprechenden Gens aktivieren oder inhibieren ([Schulz et al. 2000](#)). Die übereinstimmende DNA-Bindungssequenz der GRE ist eine 15 bp-Sequenz bestehend aus GGTACA(nnn)TGTTCT. Man geht von 10-100 Genen pro Zelle aus (< 1 %), die auf diese Weise direkt reguliert werden ([Barnes 1998](#)). Über diesen Mechanismus erfolgt z. B. die Induktion der Synthese endogener antiinflammatorischer Proteine wie IL-10 oder Lipocortin 1. Über Lipocortin 1 kommt es zu einem Eingriff in die Arachidonsäurekaskade im Sinne einer Suppression der Synthese von Leukotrienen und Prostaglandinen durch Hemmung der zytosolischen Phospholipase A₂.

Andererseits interferiert der Steroid-Rezeptor-Komplex mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AP-1, STAT und NFAT, und hemmt dadurch indirekt die Transkription von Genen ([Vanden Berghe et al. 1999](#)). Dieser Mechanismus hat besondere Bedeutung für die Expressionshemmung proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-2, IL-6, TNF α , IFN γ). Der Steroid-Rezeptor-Komplex blockiert dabei zum einen die Bindung von NF- κ B an DNA-Bindungsstellen, induziert aber auch die Synthese des inhibitorischen Transkriptionsfaktors I κ B α , der die Translokation von NF- κ B in den Zellkern hemmt ([Auphan et al. 1995](#)).

Darüber hinaus geht man davon aus, dass Glucocorticoide nicht nur die genomvermittelte Transkription hemmen, sondern auch posttranskriptionell RNA-Translation und Proteinexpression beeinflussen. Es wird eine Modifikation der mRNA und der posttranslationalen Prozessierung von Zytokinen angenommen ([Adcock et al. 2001](#), [1995](#), [Adcock 2000](#)).

Für die Beschreibung cGR-vermittelter transkriptionsabhängiger Effekte gilt:

- *zeitliche Latenz des Wirkungseintritts (30 Minuten bis Stunden)*
- *ab einer Konzentration von 10-12 M im Plasma nachweisbar*
- *längere Zeit nach Elimination des Glucocorticoids aus Extrazellulärraum nachweisbar*
- *vorwiegend antiinflammatorische Wirkung schon bei niedrigen Konzentrationen*
- *vorwiegend immunsuppressiv bei höheren Konzentrationen*
- *blockierbar durch Aktinomycin und Cycloheximid (Hemmung der Transkription bzw. Proteinsynthese)*

Nichtgenomische Wirkungen

In den letzten Jahren wurden schnell eintretende Glucocorticoidwirkungen („*rapid effects*“) beobachtet, die mit den Kriterien für genomische Wirkmechanismen nicht vereinbar waren. Die als nichtgenomisch bezeichneten Wirkungen sind Gegenstand der gegenwärtigen Steroidforschung ([Lösel et al. 2003](#), [Buttgereit et al. 2002](#), [Borski et al. 2002](#), [Cato et al. 2002](#), [Schmid et al. 2000](#), [Falkenstein et al. 2000](#)). Es gelten folgende Kriterien:

- *schneller Wirkungseintritt (Sekunden bis wenige Minuten)*
- *nur kurz anhaltend*
- *von Transkription unabhängig (unempfindlich gegenüber Aktinomycin)*
- *von Proteinsynthese unabhängig (unempfindlich gegenüber Cycloheximid)*

Spezifisch nichtgenomische Wirkungen (Modul II)

Nichtgenomische Effekte, die bereits bei niedrigen Glucocorticoidkonzentrationen eintreten, werden wahrscheinlich spezifisch über einen membranständigen Glucocorticoidrezeptor (mGR) vermittelt und beeinflussen im Weiteren schnelle second messenger-Systeme über IP₃, cAMP, PKC und Ca²⁺ ([Buttgereit et al. 1998](#)).

Humane membranständige Steroidrezeptoren konnten für Östrogen, Testosteron, Progesteron und Vitamin D nachgewiesen und funktionell charakterisiert werden ([Levin 2002](#), [Wunderlich et al. 2002](#), [Luconi et al. 2002](#), [Norman et al. 2002](#)). Membranständige Glucocorticoidrezeptoren

wurden zwar wiederholt an tierischen Zellen beschrieben ([Gametchu et al. 1984](#), [Gametchu 1987](#), [Orchinik et al. 1991](#), [1992](#), [Evans et al. 1998](#), [Chen et al. 1999](#), [Borski 2000](#)). Sie konnten aber vorerst nur an der humanen Leukämiezelllinie CCRF-CEM sowie an Lymphozyten leukämischer Patienten nachgewiesen werden ([Gametchu et al. 1993](#), [1999](#)). Gametchu et al. postulierten auch eine Korrelation der Expression membranständiger Glucocorticoidrezeptoren mit der Induktion von Apoptose ([Diba et al. 2001](#), [Chen et al. 1999](#), [Sackey et al. 1997](#), [Gametchu et al. 1987](#), [2002](#)). Kürzlich gelang es unserer Arbeitsgruppe durch Anwendung einer hochsensitiven Immunfluoreszenzfärbung humane membranständige Glucocorticoidrezeptoren auch unter physiologischen Bedingungen an humanen Monozyten und B-Lymphozyten nachzuweisen ([Bartholome et al. 2004](#)).

Es werden mittlerweile einige spezifisch nichtgenomische Effekte mit schneller Signaltransduktion an verschiedenen Zellsystemen diskutiert. Qiu et al. beschrieb die schnelle Hemmung des nikotininduzierten Ca^{2+} -Influx an einer Phäochromozytomzelllinie (PC12) sowie schnelle Aktivierung von p38, JNK und ERK1/2-MAPK ([Qiu et al. 1998](#), [2001](#)). Borski et al. zeigten an primären Fisch-Hypophysenzellen eine schnelle Hemmung der Prolaktin-Freisetzung *in vitro* innerhalb von 10-20 Minuten, begleitet von einer schnellen Reduktion des intrazellulären Ca^{2+} - und cAMP-Levels ([Borski et al. 1991](#), [2002](#)).

Es wird diskutiert, dass der mGR ein eigenständiges Genprodukt darstellt, wie es für den Progesteronrezeptor von Falkenstein et al. und Bernauer et al. angenommen wird ([Falkenstein et al. 1996](#), [Bernauer et al. 2001](#)). Gametchu et al. gehen im Gegensatz dazu davon aus, dass es sich um eine splice-Variante des zytosolischen Glucocorticoidrezeptors handelt, die in die Plasmamembran intergriert werden kann ([Chen et al. 1999](#)). Razandi et al. konnten für Östrogene nachweisen, dass nukleäre und membranständige Östrogenrezeptoren von einem gemeinsamen Gentranskript abstammen ([Razandi et al. 1999](#)).

Unspezifisch nichtgenomische Wirkungen (Modul III)

Werden sehr hohe Glucocorticoiddosen appliziert, geht man zusätzlich von einem *unspezifisch nichtgenomischen* Mechanismus aus, der über physikochemische Wechselwirkungen des Glucocorticoidmoleküls mit Biomembranen vermittelt wird und nicht durch spezifische Antagonisten hemmbar ist. Wahrscheinlich interkalieren die Moleküle in Zell- und Mitochondrienmembranen anstelle des strukturell verwandten Cholesterinmoleküls ([Buttgereit et al. 1998](#)). Daraus resultierende Modulationen von Membraneigenschaften, wie die veränderte Membranfluidität und erhöhte osmotische Resistenz im Sinne einer Membranstabilisierung mit

Beeinflussung der Kationenpermeabilität durch Veränderung des transmembranären elektrischen Potenzials (Hemmung des Transports von Ca^{2+} , K^+ und Na^+ über die Membran) und die Veränderungen im Phospholipidstoffwechsel führen zu einer Beeinflussung des zellulären Energiestoffwechsels. Schmid et al. konnten in *in vitro*-Experimenten mit Con A-stimulierten humanen Lymphozyten eine Reduktion des zellulären Sauerstoffverbrauchs durch sehr hohe Dosen von Methylprednisolon im Bereich von 10^{-4} M zeigen, während die Proteinsynthese hierdurch kaum beeinflusst wurde ([Schmid et al. 2000](#)). Buttgereit et al. wiesen nach, dass durch sehr hohe Dosen von Methylprednisolon im gleichen Konzentrationsbereich der Ca^{2+} - und Na^+ -Influx in Con A-stimulierten Rattenthymozyten gehemmt wird ([Buttgereit et al. 1997](#)). Vergleichbar hohe Konzentrationen werden *in vivo* bei der intravenösen Stoßtherapie oder bei intraartikulären Injektionen erreicht. Buttgereit et al. konnten zudem zeigen, dass die Beeinflussung des zellulären Energiestoffwechsels dabei nicht durch eine verminderte ATP-Bereitstellung infolge einer direkten Hemmung der oxidativen Phosphorylierung erfolgt, sondern durch eine nichtgenomisch vermittelte Inhibition ATP-verbrauchender Prozesse wie dem Kationentransport über die Membran ([Buttgereit et al. 1993](#)). Die unspezifisch nichtgenomische Modulation des zellulären Energiehaushalts durch Glucocorticoide hat Einfluss auf die Immunfunktion der Zelle ([Buttgereit et al. 2002](#), [2000](#)). In den letzten Jahren konnten verschiedene Zellsysteme hinsichtlich ihres zellulären Energiestoffwechsels quantifiziert und durch den Vergleich ATP-bildender und -verbrauchender Prozesse umfassend energetisch bilanziert werden ([Buttgereit et al. 1991](#), [1992](#), [1995](#), [Schmid et al. 2000](#), [Kuhnke et al. 2003](#)).

Erweiterung des modularen Wirkmodells

Neuen Hinweisen zufolge können schnelle Glucocorticoidwirkungen auch infolge spezifischer Interaktionen mit dem $\text{cGR}\alpha$ transkriptionsunabhängig hervorgerufen werden. Dabei werden schnelle intrazelluläre Signaltransduktionswege aktiviert ([Buttgereit et al. 2002](#), [Borski et al. 2002](#), [Cato et al. 2002](#), [Reichardt et al. 2001](#)).

Croxtall et al. konnten nachweisen, dass die dexamethasonabhängige Phosphorylierung von Lipocortin 1 bereits sehr früh nach 5 Minuten eintritt und trotzdem über zytosolische Glucocorticoidrezeptoren vermittelt ist. Sie kann durch RU486 antagonisiert werden, zeigt aber keine Sensitivität gegenüber Aktinomycin. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus durch Kinasen wie src, die neben den Hitzeschockproteinen zusätzlich am Multi-Protein-Komplex des zytosolischen Glucocorticoidrezeptors assoziiert sind, vermittelt ist ([Pratt 1998](#), [Croxtall et al. 2000](#)).

Solito et al. zeigten, dass Dexamethason die Serin-Phosphorylierung von Annexin 1 und die Translokation an die Zellmembran innerhalb von 30 Minuten induziert und dass dieser PKC- und IP₃-abhängige Signaltransduktionsweg durch RU486, nicht aber durch Aktinomycin oder Cycloheximid blockierbar ist ([Solito et al. 2003](#)).

Zudem konnte gezeigt werden, dass auch verschiedene schnelle Signaltransduktionswege, die rezeptorabhängig, aber transkriptionsunabhängig sind, eine Rolle bei der glucocorticoid-induzierten Apoptose spielen. Dexamethason führt in Maus-Thymozyten zu einer schnellen aSMase-abhängigen Ceramidinduktion innerhalb von 15 Minuten. In der Folge kommt es zur Aktivierung von Caspasen (8, 9 und 2) und Apoptose. Zudem induziert Dexamethason innerhalb von 5 Minuten die PKC- und PI-PLC-abhängige Generation von DAG als Voraussetzung für die Aktivierung der aSMase ([Cifone et al. 1999](#)). Marchetti et al. konnten zudem zeigen, dass PI-PLC an die Glucocorticoidrezeptor-assoziierte Src-Kinase bindet und Dexamethason die Phosphorylierung und Aktivierung der PI-PLC induziert. Die src-abhängige Aktivierung der PI-PLC ist ein Teil des Signaltransduktionswegs der Dexamethason-induzierten Apoptose ([Marchetti et al. 2003](#)).

1.2 Struktur-Wirkungsbeziehung von Glucocorticoiden

Durch Hydroxylierungen von Cortison an den Positionen 11, 17 und 21 entsteht Cortisol mit einer verstärkten Bindungsaffinität zum cGR. Kristallstrukturanalysen der cGR α -Ligandbindungsdomäne weisen auf ein umfangreiches Wasserstoffbrückennetz zwischen den Hydroxylgruppen der Glucocorticoide und dem cGR α hin ([Bledsoe et al. 2002](#)). Die Differenzierung von mineralocorticoiden und glucocorticoiden Wirkungen gelang durch die Einführung einer zweiten Doppelbindung zwischen den C-Atomen an Position 1 und 2 am Ring A des Cortisols ([Shroot et al. 1982](#)). Das daraus resultierende Prednisolon hat eine vierfach stärkere glucocorticoide und eine nur zweidrittel so starke mineralocorticoide Wirksamkeit als Cortisol. Halogenierungen an Position 9 α und 6 α steigert die Bindungsaffinität an den cGR α aber auch an den Mineralocorticoidrezeptor. Eine weitere Monohalogenierung an Position 16 steigert dagegen die glucocorticoide Wirksamkeit nochmals und lässt die mineralocorticoide Wirksamkeit fast vernachlässigbar klein werden ([Rupprecht et al. 1993](#), [Dahlberg et al. 1984](#)).

In der vorliegenden Arbeit wurde *Dexamethason* als systemisch wirksame Referenzsubstanz verwendet. In der klinischen Praxis wird es sowohl systemisch als auch topisch (z.B. inhalativ,

intraartikuläre Injektion) appliziert. Durch seine Methylierung an Position 16 gehört es zu den am stärksten wirksamen synthetischen Cortisolanaloga.

Dem Einsatz systemischer Glucocorticoide stehen als weitere Applikationsform *topische* Glucocorticoide gegenüber. Sie sind v.a. bei der inhalativen Therapie von Atemwegserkrankungen, insbesondere des Asthma bronchiale (Budesonid, Beclomethason) und bei Haut- und Schleimhauterkrankungen (Clobetasol) indiziert, werden aber auch für intraartikuläre Injektionen bei entzündlichen Gelenkerkrankungen verwendet.

Topische Glucocorticoide, die in der Dermatologie zum Einsatz kommen, wirken ebenso wie die systemischen Glucocorticoide antiinflammatorisch, antiproliferativ und immunsuppressiv. Lokal werden dabei v.a. die Glukosaminoglykansynthese in der Dermis und der Stoffwechsel der Fibroblasten gehemmt (Proliferationsrate). Man geht bisher davon aus, dass Corticoidexterna vor allem über den cGR-vermittelten genomischen Weg wirken. Topische Glucocorticoide der vierten Generation (soft-steroids) haben eine besonders hohe Bindungsaffinität. Ab einer bestimmten lokalen Glucocorticoidkonzentration kommt es zu keiner weiteren Steigerung der entzündungshemmenden Wirkung, wahrscheinlich weil dann die maximale Rezeptorbindung erreicht ist ([Brazzini et al. 2002](#)).

Man unterscheidet vier Generationen und vier Wirkstärkeklassen corticoidhaltiger Dermatopika. *Clobetasol-17-propionat* ist ein stark wirksames topisches Glucocorticoid der Klasse IV aus der zweiten Generation. Es ist an C-Atom 9 fluoriert und an C-Atom 17 verestert. Veresterungen an Position 17 α sind für die topische Therapie entscheidend. Sie erhöhen die Lipophilie, so dass eine bessere lokale Penetration erreicht werden kann ([Gysler et al. 1999](#)). Sie sind aber auch für eine erhöhte Bindungsaffinität zum cGR α verantwortlich ([Shroot et al. 1982](#)).

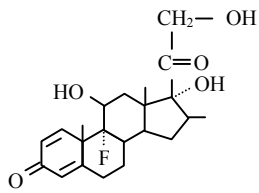
Aufgrund ihrer guten therapeutischen Effektivität und ihres geringen Nebenwirkungsprofils haben topische inhalative Glucocorticoide die systemischen Glucocorticoide vor allem in der Langzeittherapie verschiedener *pulmonaler Erkrankungen* zunehmend verdrängt.

Bekannt sind dabei genomisch und unspezifisch nichtgenomisch vermittelte Effekte. Überwiegend nukleär gesteuert ist die entzündungshemmende Wirkung (spezifische Proteinsynthese, z.B. Lipocortin 1-abhängige Inhibition der zytoplasmatischen PLA₂ im Arachidonsäuremetabolismus, [Adcock et al. 1996](#)). Über einen nukleären Mechanismus gehemmt werden auch Antigenpräsentation, Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und

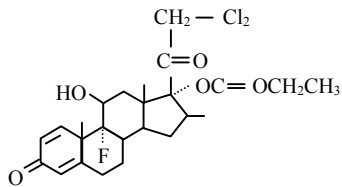
Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder AP-1 und damit die Zytokinproduktion von IL-6 u.a. ([Whelan et al. 1999](#), [Lozewicz et al. 1992](#), [Masuyama et al. 1994](#)).

Es wird angenommen, dass der Rückgang der bronchialen Hyperreagibilität nichtgenomisch über eine Modulation des Ca^{2+} -Influx und –Efflux vermittelt ist. Weitere unspezifisch vermittelte Effekte einer topischen Glucocorticoidtherapie sind die antiödematöse Wirkung (anti-leakage-Effekt), die reduzierte Hyper- (Dys-)krinie (anti-glue-Effekt), die Inhibition der Lipidperoxidation und die verminderte Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Dabei kommt es über eine Interkalierung in die Zellmembran zu einer Membranstabilisierung, wobei Plasmakonzentrationen von $> 10^{-6}\text{M}$ erforderlich sein sollen.

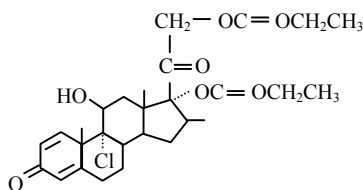
Beclometason-17,21-dipropionat wird als prodrug inhaliert. Es ist an C-Atom 9 chloriert und an C-Atom und 21 verestert. Während die Veresterung an Position 17α die lipophilen Eigenschaften und die Bindungsaffinität zum cGR erhöhen, werden sie durch die Doppelveresterung am C-Atom 21 über einen negativen sterischen Effekt der Seitenkette erniedrigt. Glucocorticoid-Doppelester besitzen also eine Bindungsaffinität, die zwischen der Bindungsaffinität von 17-Estern und 21-Estern liegt ([Shroot et al. 1982](#), [Ponec et al. 1986](#)). Beclomethason-17,21-dipropionat wird in der Lunge durch Hydrolyse am C-Atom 21 in den biologisch aktiven Metaboliten umgewandelt.



Dexamethason



Clobetasol



Beclomethason

Abb. 3: Chemische Struktur von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason.

1.3 Bisherige Untersuchungen zu Wirkungsprofilen von Glucocorticoiden

Buttgereit et al. und Schmid et al. konnten zeigen, dass sich die relativen Wirkpotenzen von Glucocorticoiden nicht nur hinsichtlich ihrer genomischen sondern auch ihrer nichtgenomischen Wirkmechanismen unterscheiden. Sie untersuchten den schnellen unspezifischen Einfluss verschiedener Glucocorticoide auf den zellulären Energiestoffwechsel, Proteinbiosynthese, Na^+/K^+ - und Ca^{2+} -ATPase an Rattenthymozyten bzw. humanen Lymphozyten. Die eingesetzten Glucocorticoide riefen inhibitorische Effekte auf die Zellatmung und ATP-verbrauchende Prozesse über einen weiten Konzentrationsbereich hervor. Den Äquivalenzdosen entsprechend wurde die relative Wirkpotenz ermittelt. Dexamethason besitzt eine um etwa 50 % stärkere nichtgenomische Potenz als Methylprednisolon. Prednisolon weist nur etwa ein Drittel der

Potenz von Methylprednisolon auf. Es konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Glucocorticoide in ihren nichtgenomischen Potenzen von den genomischen abweichen ([Buttgereit et al. 1999](#), [Schmid et al. 2000](#)).

Croxtall et al. verglichen zwölf Glucocorticoide bezüglich genomisch und nichtgenomisch vermittelter Effekte in A549 Zellen ([Croxtall et al. 2002](#)). Dabei zeigte Beclomethason im Vergleich zu Dexamethason eine deutlich stärkere Potenz in Bezug auf Zellwachstum, PGE₂-Generation und COX2-Expression, während alle topischen Glucocorticoide keinen signifikanten Einfluss auf den Arachidonsäuremetabolismus und die Aktivierung der zytoplasmatischen PLA₂ zeigten.

1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

In vorausgegangenen Arbeiten zum Vergleich nichtgenomischer Wirkungsstärken verschiedener systemisch wirksamer Glucocorticoide wurden sehr deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Glucocorticoiden – abweichend von der gut bekannten Hierarchie für genomische Wirkungen – gefunden. In Fortsetzung dieser Arbeiten stellte sich die Frage nach den nichtgenomischen Wirkungen von topisch applizierten Glucocorticoiden. Die Arbeitshypothese war, dass gerade bei diesen Substanzen eine sehr starke nichtgenomische Wirksamkeit vorliegen sollte. Diese Hypothese begründete sich aus der Tatsache, dass topisch angewandte Glucocorticoide lokal (Haut, Bronchialschleimhaut) so hohe Konzentrationen erreichen, dass auch nichtgenomische Mechanismen ihre gute klinische Wirksamkeit begründen.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher erstmals an zwei topisch wirksamen Glucocorticoiden, Clobetasol und Beclomethason, *ex vivo* die nach den einzelnen Wirkungen differenzierte Dosis-Wirkungs-Relation an humanen Zellen des Immunsystems im Vergleich zu Dexamethason ermittelt werden. *Clobetasol-17-propionat* (Dermoxinale[®]) wird in der Gruppe IV geführt, zählt also in der Dermatologie zu den am stärksten wirksamen Glucocorticoiden. Eine sinnvolle Ergänzung dieser Untersuchungen stellte die vergleichende Messung der Effekte von *Beclomethason-17,21-dipropionat* (Sanasthmyl[®]) dar, da es zu den wirksamsten Substanzen in der topischen (inhalativen) Therapie des Asthma bronchiale zählt ([Lipworth 1993](#)).

Mit diesen beiden Substanzen sollten topisch angewandte Medikamente untersucht werden, um deren Wirkmechanismus näher zu charakterisieren und um die biochemische Basis für deren

hohe Wirkungsstärke zu erforschen. Diese beiden Medikamente waren für unsere Untersuchungen besonders geeignet, da ihre Wirkungen zur Behandlung dermatologischer und pneumologischer Erkrankungen gut bekannt und dokumentiert sind. Des Weiteren waren von ihnen als topisch wirksame Substanzen und aufgrund von klinischen Überlegungen sowohl genomische als auch nichtgenomische Wirkungen zu erwarten.

Deshalb wurde ihr Einfluss auf die mitogen stimulierte IL-6-Synthese humaner PBMC mittels ELISA (genomischer Wirkmechanismus, [Buttgereit et al. 1995](#)) und ihre Effekte auf den Sauerstoffverbrauch humaner PBMC mittels Clark-Elektrode (unspezifisch nichtgenomischer Wirkmechanismus, [Buttgereit et al. 1997](#)) untersucht. Zur besseren Interpretation der für die verschiedenen Glucocorticoide gewonnenen Ergebnisse zum Sauerstoffverbrauch wurde vergleichend der Atmungskettenhemmstoff Myxothiazol untersucht. Myxothiazol bindet an Cytochrom c der mitochondrialen Elektronentransportkette und hemmt damit direkt und irreversibel den weiteren Elektronenfluss vom Cytochrom-b/c₁-Komplex zum Cytochrom-Oxidase-Komplex. Damit wird die treibende Kraft für die mitochondriale ATP-Synthese blockiert. In Hinsicht auf den postulierten unspezifisch nichtgenomischen Wirkmechanismus der Glucocorticoide war es sinnvoll, den Vergleich zu einem bekannten Hemmstoff der Atmungskette herzustellen. Bei der glucocorticoid-induzierten Apoptose geht man davon aus, dass sie über alle drei bekannten Mechanismen wirkt (genomisch, spezifisch/unspezifisch nichtgenomisch). Es wurde daher durchflusszytometrisch der Einfluss der topischen Glucocorticoide auf Apoptose humaner PBMC untersucht. Am Ende der Untersuchungen sollte eine klare Aussage stehen, welche Wirkungen bei welchen Konzentrationen in welchem Umfang auftreten. Eine derartige komplette Charakterisierung von einzelnen Glucocorticoiden existiert derzeit nicht und wurde daher mit dieser Arbeit erstmalig angestrebt. Erkenntnisse dieser Art sind für die klinische Medizin (gezielter Einsatz), aber auch für die pharmazeutische Industrie („drug design“) von großer Bedeutung.

Die Untersuchungen wurden an humanen Lymphozyten des peripheren Blutes durchgeführt, weil sie eine zentrale Stellung in der zellulären und humoralen Immunantwort einnehmen und eine bedeutende Rolle in der Ätiopathogenese und Therapie immunologischer und autoimmunologischer Erkrankungen spielen. Sie sind stimulierbar, teilungsfähig und besitzen alle wichtigen Zellbestandteile und Funktionen. Sie sind ein wesentlicher Bestandteil des peripheren Blutes und als PBMC in ausreichender Menge erhältlich.

2. Material und Methoden

2.1 Präparation humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes mittels Dichtegradientenzentrifugation

Zur Präparation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) wurden 2 bis 6 Stunden alte buffy coats gesunder Blutspender der Blutspende der Charité verwendet. Unter einem „buffy coat“ versteht man die Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten, die sich nach Zentrifugation von Vollblut zwischen der Plasmaphase und den sedimentierten Erythrozyten bildet.

2.1.1 Isolierung und *in vitro*-Inkubation von PBMC zur Messung des Sauerstoffverbrauchs

Inkubationsmedium

Das Inkubationsmedium war ein Mischmedium aus Borsook-Medium und Eagle-Medium in einem Verhältnis von 1:1,54. Es enthielt keine Glucose. Das Eagle-Basalmedium wurde mit Hanks-Puffer im Verhältnis von 1:1 ohne Glutamin und NaHCO_3 versetzt ([Eagle et al. 1955](#)). Dem Borsook-Medium (0,15 M Tris-/HCl-Pufferlösung, pH = 7,4) wurden 19 L-Aminosäuren mit einer Endkonzentration von je 0,2 mM zugesetzt ([Borsook et al. 1971](#)). Unmittelbar vor Verwendung wurde das Borsook-Eagle-Medium durch einen sterilen Einmalfilter mit einer Porengröße von 0,2 μm sterilfiltriert.

Präparation

Die PBMC wurden mittels Ficoll-Paque–Dichtegradientenzentrifugation isoliert ([Bøyum 1964](#)). Als Lymphozytentrennmedium wurde eine Ficoll-Paque-Lösung (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) verwendet. Sie weist eine höhere Dichte (1,077 g/l) als Lymphozyten und Monozyten und eine geringere Dichte als Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen auf.

Es wurden 15 ml Ficoll-Paque-Plus-Lösung (Raumtemperatur) in einem 50 ml Filterröhrchen unter den Filter abzentrifugiert. Danach wurden 15 ml 0,9%ige NaCl-Lösung zugegeben, mit buffy coat auf 50 ml aufgefüllt und bei 2000 U/min 20 min zentrifugiert (BECKMANN GS-5 Zentrifuge, München, Deutschland). Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen setzten sich

dabei als unterste Schicht ab. Wegen ihrer geringeren Dichte verblieben die Lymphozyten in der Interphase zwischen Plasma- und Ficoll-Schicht, zusammen mit anderen langsam sedimentierenden Partikeln (Monozyten, Thrombozyten). Die gereinigte Lymphozytenschicht wurde abpipettiert und mit 0,9%iger NaCl-Lösung 8 min bei 1800 U/min gewaschen. Der Überstand mit restlichen Thrombozyten wurde verworfen. Das verbliebene Lymphozytenpellet wurde in 10 ml Borsook-Eagle-Medium resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis kühl gestellt (Abb. 4).

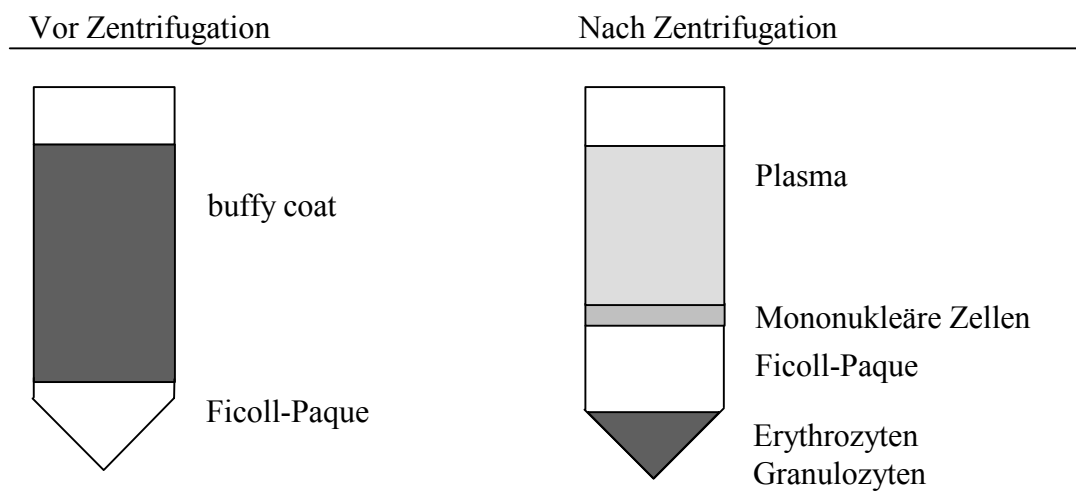


Abb. 4: Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation über einen Ficoll-Paque-Gradienten zur Isolierung von PBMC.

Die Zellzahl wurde nach Färbung mit einer 0,04%igen Trypanblaulösung im Verhältnis 1:10 und Zugabe von 10 µl in einer Neubauer-Zählkammer nach Neubauer (Mittelwert der 4 Quadranten $\times 10^4 \times$ Verdünnung \times Ausgangsvolumen) berechnet und auf eine Zellkonzentration von $1,5\text{--}2,5 \times 10^7$ Zellen/ml Medium eingestellt. Eine Zellkonzentration von mindestens 1×10^7 Zellen/ml ist für Sauerstoffverbrauchsmessungen mittels Clark-Elektrode notwendig. Die Differentialzählungen ergaben einen Anteil von über 90 % Lymphozyten sowie weniger als 10 % Monozyten und Granulozyten. Die Bestimmung der Vitalität erfolgte nach dem Trypanblau-Ausschlusstest in der Neubauer-Zählkammer. Danach betrug die Zellvitalität am Anfang einer jeden Experimentreihe mehr als 95 %.

2.1.2 Präparation, Zellkultur und *in vitro*-Inkubation von PBMC zur Messung der IL-6-Synthese und Apoptose

Zellkulturmedium

RPMI 1640 Medium (Biochrom KG, Deutschland) wird zur Zellkultur humaner Leukozyten eingesetzt. Es enthält 5,5 g/l NaCl, 5 mg/l Phenol (Indikator, rot), 2 g/l NaHCO₃, 25 mM HEPES, 0,532 g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin und 11,1 mM Glukose. Es wurde mit fetalem bovines Serum (FCS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einem Verhältnis von 1:10 versetzt. FCS wurde vor Gebrauch 30 min bei 56 °C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Die Hitzeinaktivierung diente der Komplement-, Fibrinogen- und Enzymzerstörung neben der Vermeidung allgemein störender Einflüsse des Serums (Viren, Mykoplasmen, Vitamine).

Präparation

35 ml der mit PBS (Phosphate Buffered Sodium Solution, Roth, Karlsruhe, Deutschland) in einem Verhältnis von 1:5 verdünnten buffy-coats wurden auf 15 ml Ficoll-Paque-Plus-Lösung vorsichtig aufgeschichtet. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 2000 U/min (Raumtemperatur) wurde die Leukozyteninterphase abgenommen und zweimal in PBS 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in RPMI 1640 aufgenommen und 2 h im Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂) inkubiert. Diese Inkubationszeit diente der Monozyten-/Makrophagen-Adhärenz. Danach wurde die Zellsuspension vorsichtig abgenommen und auf eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Gewinnung des Zellüberstands zur Messung der IL-6-Synthese

Die Zellsuspension wurde auf 24-well Mikrotiterplatten zu je 1 ml aufgeteilt und 12 h im Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂) kultiviert. Der Umgehung des Monozyten-/Makrophagen-bedingten IL-6-peaks diente ein nochmaliger Mediumwechsel. Nach Zugabe der Stimulanzen und Hemmstoffe in den entsprechenden Endkonzentrationen folgte eine Inkubation über 24 h im Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂). Zur Gewinnung des Zellüberstands wurden 600-700 µl Zellsuspension pro well vorsichtig abgenommen und 8 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde abpipettiert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert bzw. bei -20 °C eingefroren.

2.1.3 Zellkultur von Jurkat-Zellen

Die Jurkat-Zellen (Klon E6-1) wurden von der ATCC (Katalog Nr. TIB-152) bezogen. Es handelt sich um eine humane akute Leukämie-T-Zelllinie, die in Suspension vorliegt. Die Kultur erfolgte in Zellkulturflaschen (Fa. Costar) mit einem Gesamtvolumen von 300 ml. Die Zellen wurden in RPMI 1640 unter Zusatz von 10 % FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin kultiviert. Der Medienwechsel und das Umsetzen der Zellen fand bei einer Dichte von etwa 5×10^5 Zellen/ml nach 2-3 Tagen statt. Die Zellen wurden bei 37 °C in einem CO₂-begasten Inkubator kultiviert. Die Prüfung der Zellvitalität erfolgte nach dem Trypanblau-Ausschlusstest und durchflusszytometrisch am FACS nach Propidiumjodid-Färbung (siehe 2.4).

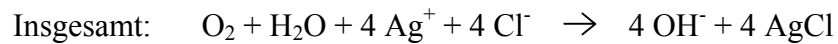
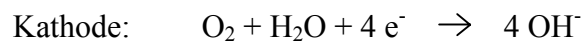
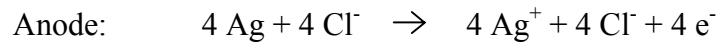
2.2 Amperometrische Quantifizierung des zellulären Sauerstoffverbrauchs

2.2.1 Prinzip

Der zelluläre Energiestoffwechsel wurde amperometrisch mittels einer Clark-Elektrode ([Clark 1959](#)) anhand des Sauerstoffverbrauchs quantifiziert.

Die Zellsuspension wurde dazu in ein luftdicht abgeschlossenes Messgefäß überführt. Mittels einer polarisierbaren Clark-Elektrode ließ sich die Sauerstoffkonzentration innerhalb der Messlösung kontinuierlich bestimmen. Dem Messverfahren liegt eine Redoxreaktion zugrunde. Ein Sauerstoffmolekül nimmt an der negativ polarisierten Elektrode (Kathode) vier Elektronen auf und wird mit zwei Wassermolekülen zu vier Hydroxylionen reduziert. Der durch den Elektronenfluss bedingte Strom ist das Messsignal. Da für jedes entladene Sauerstoffmolekül vier Elektronen fließen, kann aus dem Messstrom auf die Anzahl reduzierter Sauerstoffmoleküle geschlossen werden. Der resultierende Stromfluss ist also bei gegebener Spannung dem Sauerstoffverbrauch proportional. Der Elektrodenraum wird von der Messlösung durch eine Polypropylen-Membran getrennt, die eine hohe Sauerstoffdurchlässigkeit besitzt. Die Arbeitselektrode (Platin) berührt die Innenseite der Membran vollständig, sodass der durch die Membran diffundierende Sauerstoff vollständig an ihr reduziert werden kann. In der KCl-Elektrolytlösung befindet sich neben der Platin-Arbeitselektrode die Silber-Gegenelektrode und die Bezugselektrode. Auf der Membraninnenseite stellt sich eine Sauerstoffkonzentration ein, die

abhängig ist von der Sauerstoffkonzentration auf der Membranaußenseite und damit von der Sauerstoffkonzentration im Messgefäß. Damit die Platinelektrode jedem Sauerstoffmolekül bei seiner Reduktion vier Elektronen liefern kann, muss die Gegenelektrode diese Elektronen zur Verfügung stellen:



Somit kann der zelluläre Sauerstoffverbrauch pro Zeiteinheit bestimmt werden ([Rapoport et al. 1977](#)).

Die Membrandurchlässigkeit ist temperaturabhängig – mit steigender Temperatur nimmt die Sauerstoffdurchlässigkeit zu. Daher wurde die Temperatur über ein Thermostat bei 37 °C streng konstant gehalten.

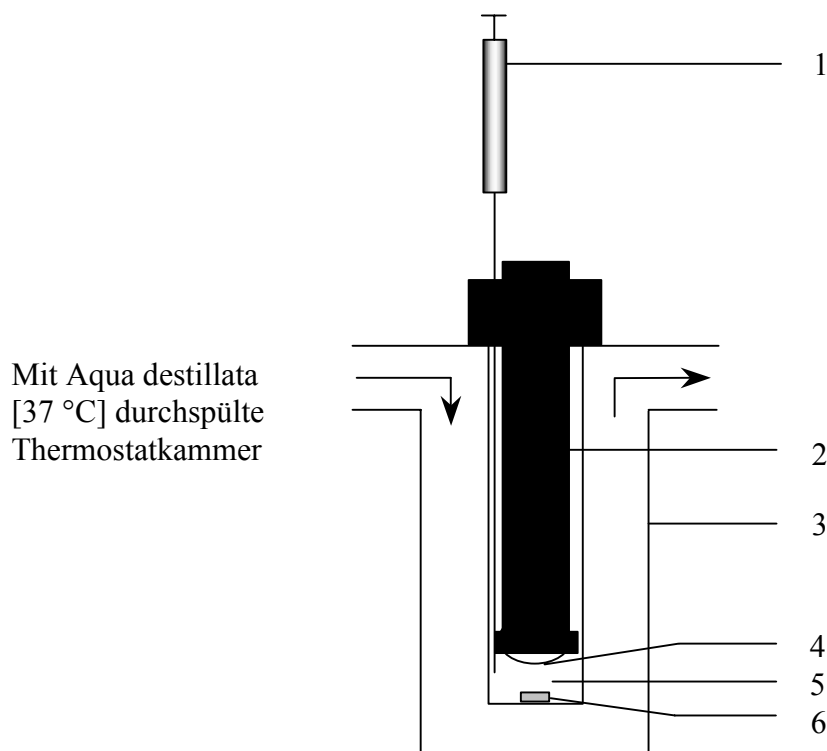


Abb. 5: Schematische Darstellung von Clark-Elektrode und Respirationsskammer.
 1 Hamilton-Spritze zur Zugabe der Testsubstanzen, 2 Clark-Elektrode, 3 Messgefäß, 4 Semipermeable Membran, 5 Respirationsskammer mit Zellsuspension, 6 Magnetrührer.

Der Zelle stehen zwei getrennte Wege der Energiegewinnung zur Verfügung: Oxidative Phosphorylierung (mitochondriale Atmung) und Glykolyse. Sie unterscheiden sich in ihrer Effektivität. Durch Glykolyse werden 2 Mol ATP pro Mol Glukose gebildet, durch oxidative Phosphorylierung 38 Mol pro Mol Glukose. Bei ausreichender Sauerstoffversorgung ist die Glykolyse zugunsten der Atmung unterdrückt (Pasteur-Effekt). In *in vitro*-Experimenten lässt sich diese Voraussetzung durch geeignete Versuchsbedingungen erzielen ([Schmid et al. 2000](#), [Kuhnke et al. 2003](#)).

Die indirekte Erfassung des Energiestoffwechsels durch den Sauerstoffverbrauch erfolgt unter der Annahme, dass im „steady state“ der Energiebedarf die Energiesynthese bestimmt ([Brown 1992](#)) und der intrazelluläre ATP-Pool konstant bleibt. Ist unter geeigneten Versuchsbedingungen die ATP-Bereitstellung durch Glykolyse zu vernachlässigen, entspricht die Änderung des Sauerstoffverbrauchs durch oxidative Phosphorylierung der resultierenden Änderung der Energiesynthese. Der Sauerstoffverbrauch ist wegen des extramitochondrialen Sauerstoffverbrauchs und des Protonenleaks nicht dem Energieverbrauch gleichzusetzen. Anhand des Sauerstoffverbrauchs lassen sich aber somit Einflüsse auf den Energieverbrauch quantifizieren.

2.2.2 Versuchsdurchführung

Für die Messung wurden 0,7 ml der PBMC-Suspension in die Respirationskammer überführt. Dies entsprach bei vorgegebener Zellkonzentration einer Zellzahl von $1,05-1,75 \times 10^7$ Zellen. Vor dem Aufsetzen der Elektrode wurde die Zellsuspension mittels Magnetrührer im Respirationsgefäß gleichmäßig und ausreichend mit Sauerstoff äquilibriert. Bei 37 °C und normalem Sauerstoffpartialdruck der Luft (Sauerstoffkonzentration 20,9 Vol%) lösten sich maximal 4,7 ml Sauerstoff pro Liter Medium, so dass nach ausreichender Äquilibration 147,7 nmol Sauerstoff in 0,7 ml der PBMC-Suspension gelöst waren. Mittels Magnetrührer wurde während der Messung ein gleichmäßiger Anstrom der Messlösung an die Membran gewährleistet, damit an der äußeren Membranseite eine konstante Sauerstoffkonzentration herrschen konnte. Die Registriergeschwindigkeit des Schreibers betrug 0,2 mm/Sekunde. Die Eichung des Gerätes (Messbereich $D_{100\%}$) erfolgte durch Mediumzugabe ohne Zellsuspension. Der Anstieg des erfassten Graphen (Dx) gab den Sauerstoffverbrauch (ΔO_2) pro Zeiteinheit (Δt) wieder (Abb. 6).

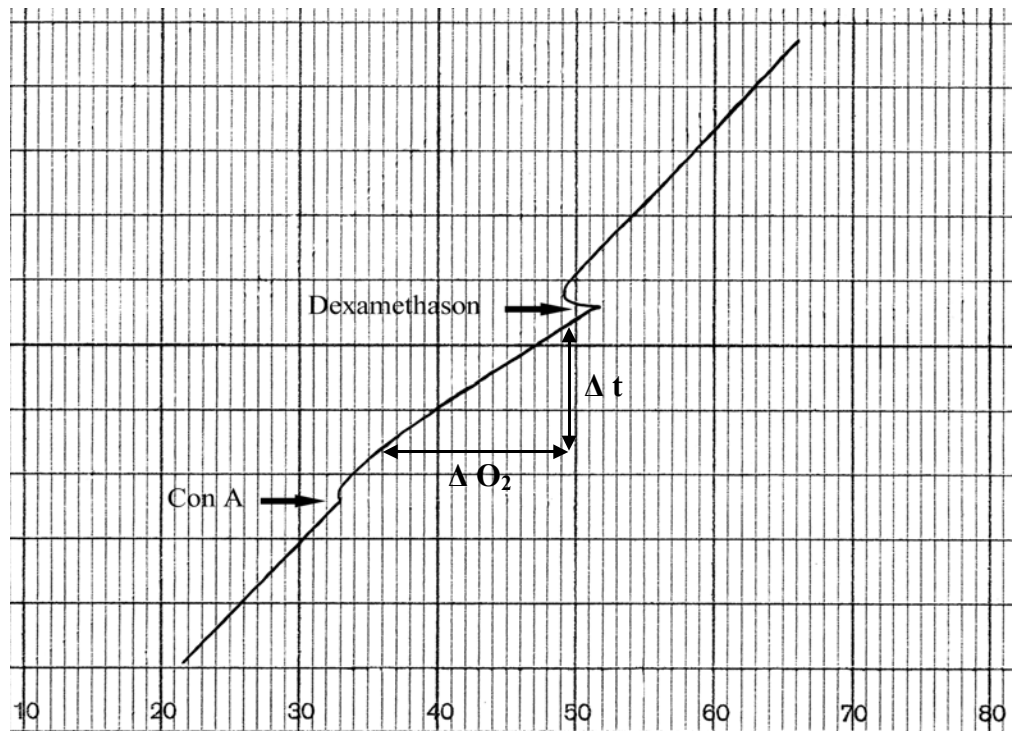


Abb. 6: Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs (ΔO_2) pro Zeiteinheit (Δt). Dargestellt ist beispielhaft die Zugabe von Con A und Dexamethason (10^{-4} M).

Der Sauerstoffverbrauch der PBMC im Respirationsgefäß lässt sich nun normiert auf nmol/min/ 10^7 Zellen wie folgt berechnen:

$$O_2\text{- Verbrauch [nmol/min/}10^7\text{ Zellen]} = \frac{Dx [\text{cm/min}] \times 147,7 [\text{nmol}]}{D_{100\%} [\text{cm}] \times \text{Zellzahl}/0,7 \text{ ml}}$$

Zur Untersuchung des Einflusses der Glucocorticoide auf den zellulären Energiestoffwechsel wurden die Zellen mit $75 \mu\text{g Con A/ml}/10^7$ Zellen für 3 min stimuliert und bei maximaler und konstanter Stimulation die Glucocorticoide in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben. Die Verdrängung von Zellen aus der Respirationskammer während der Zugabe der Testsubstanzen wurde bei der Berechnung des tatsächlichen Sauerstoffverbrauchs berücksichtigt.

Hemmstoffe und Concanavalin A

Es wurden die Glucocorticoide Dexamethason (Fortecortin[®], Merck, Darmstadt, Deutschland), Clobetasol (Dermoxinale[®]) und Beclomethason (Sanasthmyl[®], beide GlaxoWellcome, Bad Oldesloe, Deutschland) sowie Myxothiazol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

untersucht. Dexamethason und Myxothiazol wurden in Aqua destillata, Clobetasol und Beclomethason in DMSO in einer Konzentration von 10^{-1} M gelöst. Alle Glucocorticoide wurden in Endkonzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-4} M verwendet.

Zur Stimulierung der PBMC wurde das Mitogen Concanavalin A (Con A; Serva, Heidelberg, Deutschland) eingesetzt. Es ist ein spezifisches, kohlenhydratbindendes Protein, dass aus der Schwertbohne *Conavalia ensiformis* isoliert wird und zur Gruppe der Lektine gehört ([Janeway et al. 1997](#)). Es kommt im Gegensatz zur antigenen Stimulation zu einer stark ausgeprägten unspezifischen, polyklonalen Stimulierung der Zellen. Betroffen sind vornehmlich T-Lymphozyten, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die überwiegende Anzahl der PBMC erfasst wurde. Con A wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml Aqua destillata angesetzt und in einer Endkonzentration von 75 µg/ml eingesetzt, was bei einer standardisierten Zellkonzentration von $1,5-2,5 \times 10^7$ Zellen/ml Medium einer durchschnittlichen Konzentration von 3,75 µg Con A/ 10^6 Zellen entsprach.

2.3 Nichtkompetitiver ELISA zur Quantifizierung der IL-6-Synthese

2.3.1 Prinzip

Der *enzymgekoppelte Immunadsorptionstest* (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) stellt eine quantitativ analytische Methode zur Messung von Antigen oder Antikörpern dar. Es werden unmarkierte, polyklonale anti-Zytokin-Antikörper (anti-IL-6-AK, Primärantikörper) auf einem festen Träger (Kunststoff-Mikrotiterplatten) fixiert. Nach Zugabe des Antigens (Interleukin-6-haltige Zellsuspension) lässt sich das gebundene Interleukin (IL) durch einen zweiten Antikörper (Sekundärantikörper) nachweisen. Dieser ist ein enzymmarkierter monoklonaler anti-IL-6-AK, der gegen ein anderes Epitop gerichtet ist. Damit wird mit dem ELISA eine sehr hohe Spezifität erreicht. Die Menge des Antikörpers lässt sich direkt anhand der Antigenbindung bestimmen. Der Nachweis erfolgt über eine enzymatische Reaktion, die ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umwandelt ([Kemeny 1994](#), [Liddell 1995](#)).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde ein nichtkompetitiver Test verwendet. Der Vorteil von nichtkompetitiven gegenüber kompetitiven Assays besteht darin, dass nur der unmarkierte Antikörper in einer limitierenden Konzentration vorhanden ist und so Fehler bei der Zugabe

anderer Reagenzien einen nur geringen Einfluss auf das Ergebnis haben. Die Wahrscheinlichkeit, durch unspezifische Bindungen oder Kreuzreaktionen beeinflusst zu werden, ist allerdings größer. Der von uns verwendete Test zeichnete sich daher durch eine hohe Spezifität für humanes IL-6 aus.

Festphasen-Tests sind gegenüber Flüssigphasentests sensitiver und einfacher auszuführen. Die Konzentration des Antikörpers an der Oberfläche einer Festphase ist sehr hoch. Dadurch können Antikörper weit unter den Affinitäten der beteiligten Reagenzien nachgewiesen werden. Die Hintergrundfärbung, d.h. der Anteil nichtspezifischer Bindungen kann dadurch aber erhöht sein ([Kemeny et al. 1994](#)).

IL-6-cDNA kodiert für ein aus 212 Aminosäuren bestehendes Polypeptid. Dieses Protein wird zu einem 184 Aminosäuren umfassenden Protein posttranslational prozessiert. Durch verschiedene Glykosylierungsstufen an Position 73 bzw. 172 und Phosphorylierungsstufen variiert das Molekulargewicht des IL-6-Moleküls zwischen 21,5 und 28 kDa. Die Fähigkeit, IL-6 zu synthetisieren, besitzen viele verschiedene Zellen des Immunsystems. Dazu zählen Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Mastzellen, T-Lymphozyten und verschiedene Tumorzelllinien ([Diehl et al. 2002](#), [Hirano et al. 1990](#)).

2.3.2 Durchführung

Zur Quantifizierung der IL-6-Synthese humaner PBMC kam in den folgenden Experimenten ein kommerzieller ELISA-Kit (Milenia IL-6 Endpoint Enzyme Immunometric Assay, DPC, Deutschland) mit einer Sensitivität von ca. 4 pg/ml und einer hohen Spezifität für humanes IL-6 zum Einsatz. Alle Materialien wurden bei Raumtemperatur verwendet.

Jeweils 100 µl der Kontrollen und Proben wurden an Mikrotiterplatten, die mit monoklonalem (Maus-) anti-IL-6-AK beschichtet waren, in 150 µl Serum-/Puffer-Gemisch (pH = 7,4) über 2 h adsorbiert. PHA- und Con A-stimulierte Proben wurden vor Zugabe mit Standard-/Proben-Verdünnungspuffer (IL-6-freies Serum) in einem Verhältnis von 1:10 bzw. 1:70 verdünnt. Nach Waschen mit 1:4 verdünnter Pufferlösung (5fach gepufferte Lösung mit Detergenz und Stabilisator) erfolgte die Inkubation der Proben und Kontrollen mit 200 µl Meerrettichperoxidase-konjugiertem, affinitätsgereinigtem, polyklonalem (Kaninchen-) anti-IL-6-AK für 2 h. Nicht zur Reaktion gekommenes Material wurde durch einen wiederholten

Waschschrift entfernt. Danach folgte die Zugabe der Substratlösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Wasserstoffperoxid). Die Substratumsetzung wurde mit einem säurehaltigen Stoppreagenz (2 N Salzsäure) nach 30 min beendet und die Extinktion bei 450 nm mit einem automatischen Plattenlesegerät gemessen. Die Farbintensität war direkt proportional zur IL-6-Konzentration des Zellüberstandes. Es wurde zu jedem Ansatz eine Standardreihe mitgeführt (Abb. 7). Die Verdünnung des Standards erfolgte in sechs linearen Verdünnungsschritten, so dass die Extinktionen bei linearem Verhältnis zwischen Farbdichte und Probenkonzentration und halblogarithmischer Darstellung eine sigmoide Standardkurve ergaben. Der Extinktion der höchsten Verdünnungsstufe (2,0 OD) entsprach eine Zytokin-Konzentration von 1000 pg/ml. Die Standardkurve erstreckte sich damit über 5 log-Einheiten der Verdünnung ([Westgard 1981](#)).

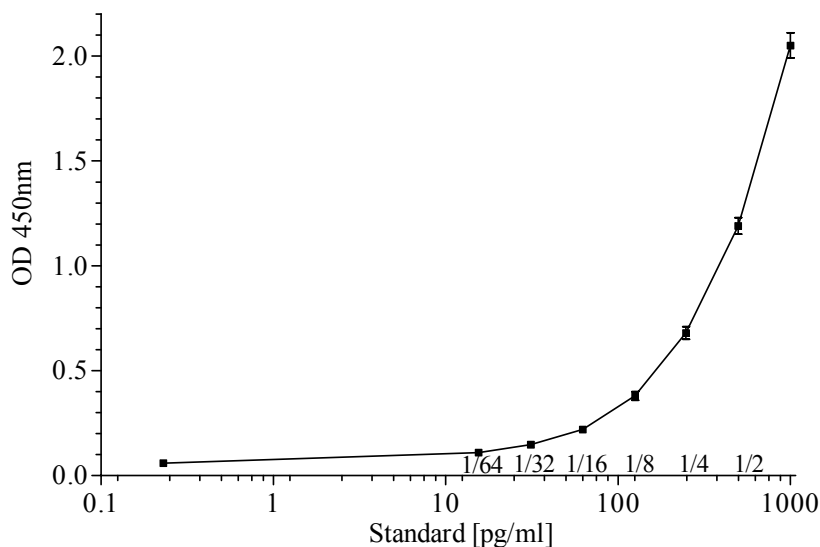


Abb. 7: Standardeckurve und Verdünnungsschritte der Standards.

Phytohämagglutinin

Das polyklonale Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) ist ein Glykoprotein, dass aus der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris* gewonnen wird. Ähnlich wie Con A stimuliert PHA unspezifisch vor allem humane T-Lymphozyten. Zur Verwendung in unseren Experimenten wurde PHA (Biochrom, Berlin, FRG) in Aqua destillata gelöst und in einer Endkonzentration von 10 µg/ml/10⁶ Zellen eingesetzt.

2.4 Durchflusszytometrie (FACS) zur Quantifizierung von Apoptose

2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode zur Analyse von Zellsuspensionen auf Einzelzellniveau (*single cell analysis*) dar. Es werden chemische und physikalische Eigenschaften wie Zellgröße und -granularität sowie antigene Zellstrukturen, an die fluoreszenzmarkierte Antikörper gebunden werden, simultan analysiert. Die Zellsuspension wird über eine Kapillare mittels Überdruck in die Messküvette gepresst. Durch die starke Beschleunigung werden Zellaggregate aufgetrennt und in das Zentrum der Messkammer fokussiert. Dieser Vorgang wird als *hydrodynamische Fokussierung* bezeichnet. Den Analysepunkt stellt ein 488 nm-Argonlaser dar. Das monochromatische Licht des Lasers ändert bei Auftreffen auf die Zelle seine Richtung und ist in Vorwärtsstreulicht, *forward scatter (FSC)* und Seitwärtsstreulicht, *side scatter (SSC)*, zu unterscheiden. Der FSC bildet die Zellgröße ab und wird entlang der Laserachse mittels Photodiode detektiert, während der SSC ein Maß für die Granularität (Membranstruktur und Beschaffenheit intrazellulärer Bestandteile) darstellt und im 90° Winkel zum Laserstrahl abgelenkt wird. Die Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren Licht in einem weiten Wellenlängenbereich. Die Emissionsspektren liegen dabei in einem langwelligeren Bereich als die Absorptionsspektren (sog. Stokes-Shift).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein Isothiocyanat (FITC) und Propidiumjodid (PI) eingesetzt. Es wurde ein Durchflusszytometer der Firma Coulter; Miami, USA mit einem 488 nm-Argonlaser, einem 635 nm-Diodenlaser und vier Fluoreszenzkanälen (FL1–FL4) verwendet. In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Durchflusszytometrie zur Messung der glucocorticoid-induzierten Apoptose eingesetzt.

2.4.2 Nachweis apoptotischer Zellen mittels Annexin V-FITC

Prinzip

Für die Messung der Apoptose wurde ein kommerzieller Annexin V-FITC Kit (Immunotech; Marseille, Frankreich) verwendet. Die Methode kombiniert die Eigenschaft von Annexin V, an Phosphatidylserin (PS) der Zellmembran zu binden mit der Gegenfärbung durch Propidiumjodid

(PI), dass zwischen Basenpaare doppelsträngiger Nukleinsäuren interkaliert. Nur bei Zellen, deren Zellmembran alteriert ist, werden intrazelluläre Proteine und DNA für PI zugänglich.

In der frühen Phase der Apoptose ist die Integrität der Zellmembran noch erhalten. Die Zellen verlieren aber bereits die asymmetrische Anordnung ihrer membranständigen Phospholipide und PS wird von der Innen- auf die Außenseite der Zytoplasmamembran verschoben. Dort verbleibt es für den Rest der Apoptosekaskade. Annexin V ist ein Phospholipid-bindendes Protein der Annexin-Familie. In Gegenwart von Ca^{2+} bindet es mit hoher selektiver Affinität an PS bevor es zu morphologischen Veränderungen und zur Hydrolysierung von DNA kommt. Durch die frühe Detektion und das ubiquitäre Vorkommen von PS war diese Methode für die Fragestellung in dieser Arbeit geeignet. *In vitro* kommt es in einer späten Phase der Apoptose zu einem Verlust der Integrität der Plasmamembran und zu einer sekundären Nekrose der Zelle. Um die apoptotischen von den sekundär-nekrotischen Zellen zu differenzieren, wird mit PI im gleichen Messansatz gegengefärbt. Wird im FSC/SSC auf die vitale Lymphozytenpopulation gated, können damit im FITC/PI-Dot plot drei Zellpopulationen unterschieden werden: 1) vitale Population 2) apoptotische Population und 3) sekundär-nekrotische Population (Tab. 1, Abb. 8).

Tab. 1: Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie nach Doppelfärbung mit FITC-konjugiertem Annexin V und PI.

	Annexin V - Färbung	Propidium Iodid - Färbung
Intakte Zellen	-	-
Apoptotische Zellen	+	-
Sekundär-nekrotische Zellen	+	+

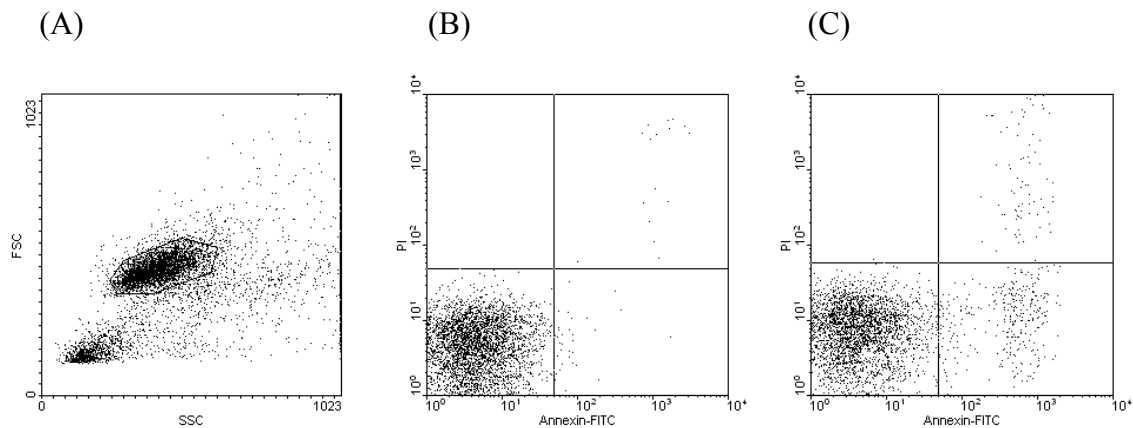


Abb. 8: (A) Zweidimensionale Dot-plot-Darstellung des FSC/SSC von humanen PBMC nach 20 h Kultur. (B) Dot-plot-Darstellung der Fluoreszenz von FITC- und PI-markierten PBMC nach 20 h Kultur und (C) nach 20 h Inkubation mit Dexamethason 10^{-4} M.

Durchführung

Die wie unter 2.1.2. beschrieben präparierten Zellen wurden auf 24-well Mikrotiterplatten zu je 0,7 ml aufgeteilt. Die Reagenzien wurden in entsprechenden Konzentrationen zugegeben und in getrennten Messansätzen für 16 h, 20 h, 36 h, 48 h oder 56 h im Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂) inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann in zwei Waschschritten mit PBS jeweils für 5 min bei 1000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 450 µl eisgekühlter Pufferlösung resuspendiert. Zur Färbung wurden 5 µl Annexin V – FITC – Lösung und 5 µl PI-Lösung zugegeben und die Zellen für 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert.

2.4.3 Nachweis apoptotischer Zellen mittels DNA-Färbung

Prinzip

Intakte Zellen enthalten high-molecular-weight DNA (HMW-DNA) im Zellkern und keine DNA im Zytoplasma. DNA in apoptotischen Zellen unterliegt einer Fragmentation durch Endonukleasen in low-molecular-weight Nukleosomen (LMW-DNA). Diese beginnen in das Zytoplasma zu migrieren, so dass der zelluläre Gehalt an nukleärer HMW-DNA abnimmt, während der Gehalt an LMW-DNA im Nukleus und im Zytoplasma zunimmt. Die Fragmentation der DNA erfolgt dabei in charakteristischen Abständen von $n (146 \pm 50)$ bp. Durchflusszytometrisch kann der DNA-Gehalt nach Färbung mit PI gemessen werden. Ein

typisches Histogramm ist in Abb. 9 und in Abb. 10 dargestellt. Apoptotische Zellen erscheinen dabei als Sub-G1-Peak auf der DNA-Achse ([Darzynkiewicz et al. 1992](#)).

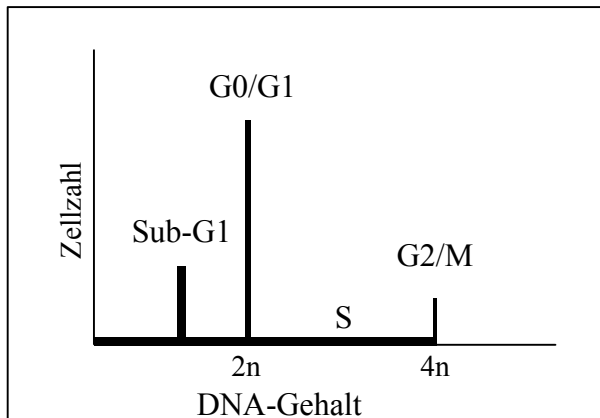


Abb. 9: Schematische Darstellung eines Histogramms mit Sub-G1-Peak.

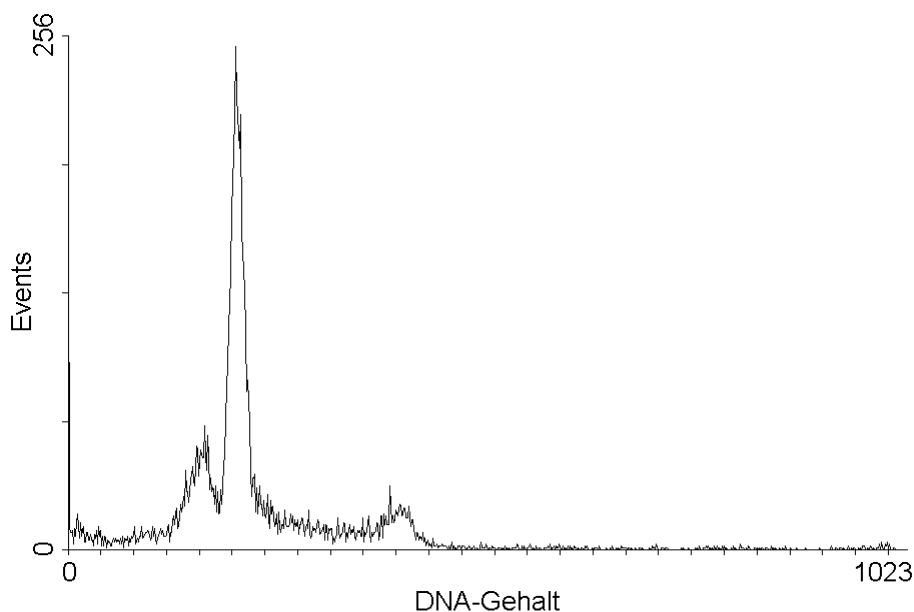


Abb. 10: Histogramm mit Sub-G1-Peak. Beispielhaft ist ein Experiment dargestellt, bei dem Apoptose von humanen PBMC durch Beclomethason 10^{-6} M induziert wurde.

Ein wichtiges Kriterium für die Genauigkeit einer durchflusszytometrischen Ein-Parameter-Analyse ist der Variationskoeffizient (VK), der anhand der Breite des G0/G1-Peaks bestimmt wird. Die Größe des VK-Wertes gibt eine standardisierte Auskunft über die Breite einer Werteverteilung, bezogen auf deren Mittelwert und wird nach folgender Formel berechnet:

$$VK = \frac{\text{Breite des G0/1-Peaks bei halber maximaler Höhe} \times 100}{\text{Kanalnummer mit den meisten gemessenen G0/1-Zellen} \times 2,35} \quad [\%]$$

Je kleiner der gemessene VK-Wert ist, um so besser ist die Auflösung und Reproduzierbarkeit der Messung. Durchflusszytometrische Messungen mit einem VK-Wert über 5,0 % wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Durchführung

Es wurde ein DNA-Kit verwendet, der uns freundlicherweise vom Institut für Immunologie und Genetik Kaiserslautern zur Verfügung gestellt wurde. Er setzte sich aus einem Triton-Puffer und einem FITC/PI-Puffer zusammen.

Die wie unter 2.1.2. beschrieben präparierten Zellen wurden analog zur Annexin V-Färbung auf 24-well Mikrotiterplatten zu je 0,7 ml aufgeteilt. Die Reagenzien wurden in entsprechenden Konzentrationen zugegeben und in getrennten Messansätzen für 16 h, 20 h, 36 h, 48 h oder 56 h im Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂) inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann zwei mal mit PBS jeweils für 5 min bei 1000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 450 µl eiskühler Pufferlösung resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 200 µl Triton-Puffer für 15 min, um die Zellen zu permeabilisieren. Danach erfolgte die Färbung mit 500 µl FITC-/PI-Puffer für 15 min.

2.4.4 CD95-exprimierende humane Jurkat-Zelllinie

Die Elimination von Zellen durch Zelloberflächenrezeptor-induzierte Aktivierung von Caspasen ist ein wichtiger immunologischer Vorgang. Ein Beispiel ist die Auslösung von Apoptose in stimulierten Lymphozyten durch die Aktivierung der Caspase 8 mittels CD95/CD95-Ligand ([Yonehara et al. 1999](#)).

Zur Induktion von Apoptose *in vitro* wurde ein monoklonaler (Maus-) anti-CD95-AK (CH-11-Klon) verwendet. Das CD95-Antigen (APO-1/Fas) ist ein transmembranes 40-50 kDa Glykoprotein. Es gehört zur Nerve Growth Factor Receptor/Tumor Necrosis Factor (NGFR/TNF) Superfamilie und enthält extrazelluläre cystein-reiche Domänen. Wichtig für die Induktion von Apoptose ist die intrazelluläre Domäne, die sogenannte Todesdomäne ([Itoh et al. 1993](#)). CD95 wird von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten,

Monozyten, NK-Zellen, Thymozyten und myeloiden Zelllinien exprimiert ([Miyawaki et al. 1992](#), [Yoshino et al. 1994](#), [Yonehara et al. 1994](#)). Unter physiologischen Bedingungen wird CD95 durch die Bindung eines spezifischen Liganden, CD95Ligand (APO-1L/FasL) aktiviert. Der agonistisch stimulierende CH-11-Antikörper induziert *in vitro* in diversen Fas-exprimierenden Zelllinien Apoptose ([Miyawaki et al. 1992](#), [Yoshino et al. 1994](#), [Yonehara et al. 1994](#)).

Wenn nicht anders angegeben, wurde die Zellsuspension 16 h mit CH-11-anti Fas-AK in einer Konzentration von 1 µg/ml bei 37 °C inkubiert.

2.5 Statistische Auswertungen

Die statistischen Tests wurden mit dem Statistik-Programm SPSS Version 11.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

2.5.1 Deskriptive Statistik

Arithmetischer Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD bzw. S.E.M.) stellen wichtige Kennwerte einer Stichprobe dar. Der Mittelwert bestimmt die durchschnittliche Größe der Stichprobenwerte und ist als deren arithmetisches Mittel definiert. Das arithmetische Mittel ist die Summe aller Beobachtungen, geteilt durch die Anzahl dieser Beobachtungen. Die Standardabweichung steht für die Streuung der Stichprobenwerte um das arithmetische Mittel. Sie ist die positive Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung. Der Standardfehler des Mittelwertes beschreibt die Streuung der Mittelwerte der Stichproben mit jeweils n Beobachtungen und ist die Standardabweichung geteilt durch die Wurzel aller Beobachtungen.

2.5.2 Parametrische und nichtparametrische Tests

Zum Vergleich zweier abhängiger (verbundener) Stichproben wurde bei nicht normaler Verteilung der nichtparametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, bei Normalverteilung der Stichproben der Student's t-Test für verbundene Stichproben verwendet. Der Vergleich zweier

nicht verbundener (unabhängiger) Stichproben erfolgte bei nicht normalverteilter Stichprobe durch den nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test, bei nachgewiesener Normalverteilung durch den Student's t-Test für unverbundene Stichproben. Das Vorliegen einer Normalverteilung errechnete sich für einen Stichprobenumfang kleiner 50 mit dem Shapiro-Wilk-Test (es lagen ausschließlich Stichprobenumfänge kleiner 50 vor). Eine statistische Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen ([Sachs 1992](#), [Trampisch et al. 1997](#)).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zum zellulären Energiestoffwechsel mittels Clark-Elektrode

3.1.1 Sauerstoffverbrauch von ruhenden und stimulierten PBMC

Abbildung 11 zeigt den basalen Sauerstoffverbrauch von ruhenden mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) im Vergleich zum Sauerstoffverbrauch nach mitogener Stimulation der PBMC. Der Sauerstoffverbrauch ruhender PBMC betrug $5,84 \pm 0,22$ nmol/min/ 10^7 Zellen ($n = 52$). Dieser und alle folgenden Werte sind als Mittelwert \pm S.E.M. (Zahl der Experimente) angegeben.

Als Modell zur Untersuchung der Reaktionsfähigkeit der PBMC auf einen definierten Stimulationsreiz diente uns die mitogene Stimulation mit dem Lektin Concanavalin A (Con A). Das Ausmaß der Stimulation ist durch die Clark-Elektrode exakt quantifizierbar. Es wurde stets die gleiche Menge Con A verwendet und nach einem konstanten Stimulationsintervall von 3 min der Sauerstoffverbrauch gemessen. Die Stimulation mit dem Mitogen Con A führte zu einem sofortigen (innerhalb von Sekunden), konstanten und statistisch signifikanten Anstieg des Sauerstoffverbrauchs um 55,4 % auf $8,89 \pm 0,45$ nmol/min/ 10^7 Zellen ($n = 40$, $p < 0,05$).

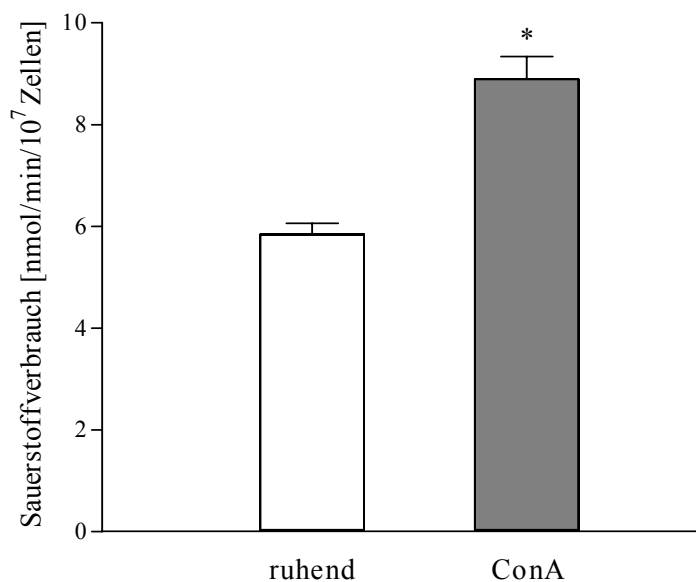


Abb. 11: Sauerstoffverbrauch von ruhenden und Con A-stimulierten PBMC. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 52$ für ruhende PBMC und $n = 45$ für stimulierte PBMC. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

3.1.2 Effekte von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol auf den Sauerstoffverbrauch von ruhenden PBMC

Um den Einfluss der Glucocorticoide auf die untersuchten Parameter in ruhenden Zellen zu ermitteln, wurden aus buffy coats präparierte Zellsuspensionen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason behandelt. Die Zellen wurden dann wie unter 2.2.2 beschrieben zur Messung des Sauerstoffverbrauchs verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt. Zum Vergleich gibt Abbildung 14 die Effekte unterschiedlicher Konzentrationen von Myxothiazol auf den Sauerstoffverbrauch ruhender PBMC wieder. Da Clobetasol, Beclomethason und Myxothiazol in DMSO gelöst waren, wurden gleiche Mengen DMSO auf dessen Effekt auf den Sauerstoffverbrauch untersucht und als Kontrolle mitgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm S.E.M. (n = Zahl der Experimente) angegeben.

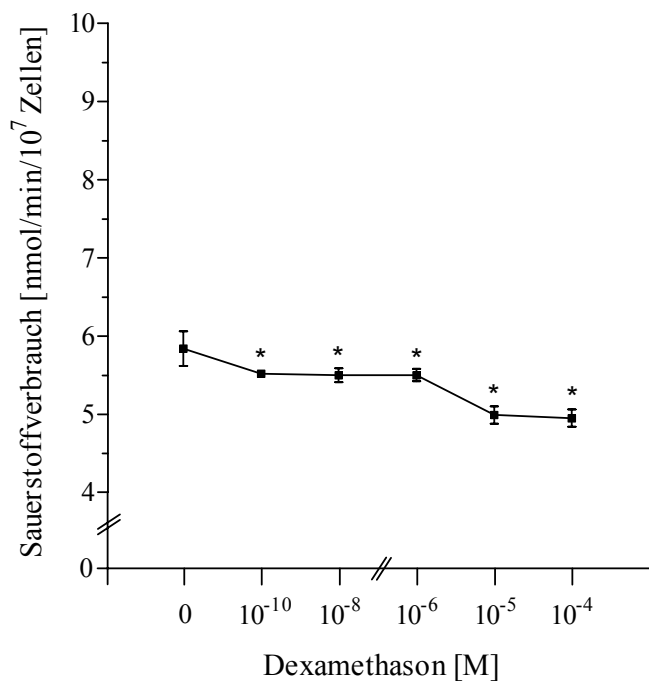


Abb. 12: Einfluss von Dexamethason auf den Sauerstoffverbrauch von ruhenden humanen PBMC. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug n = 6-9. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

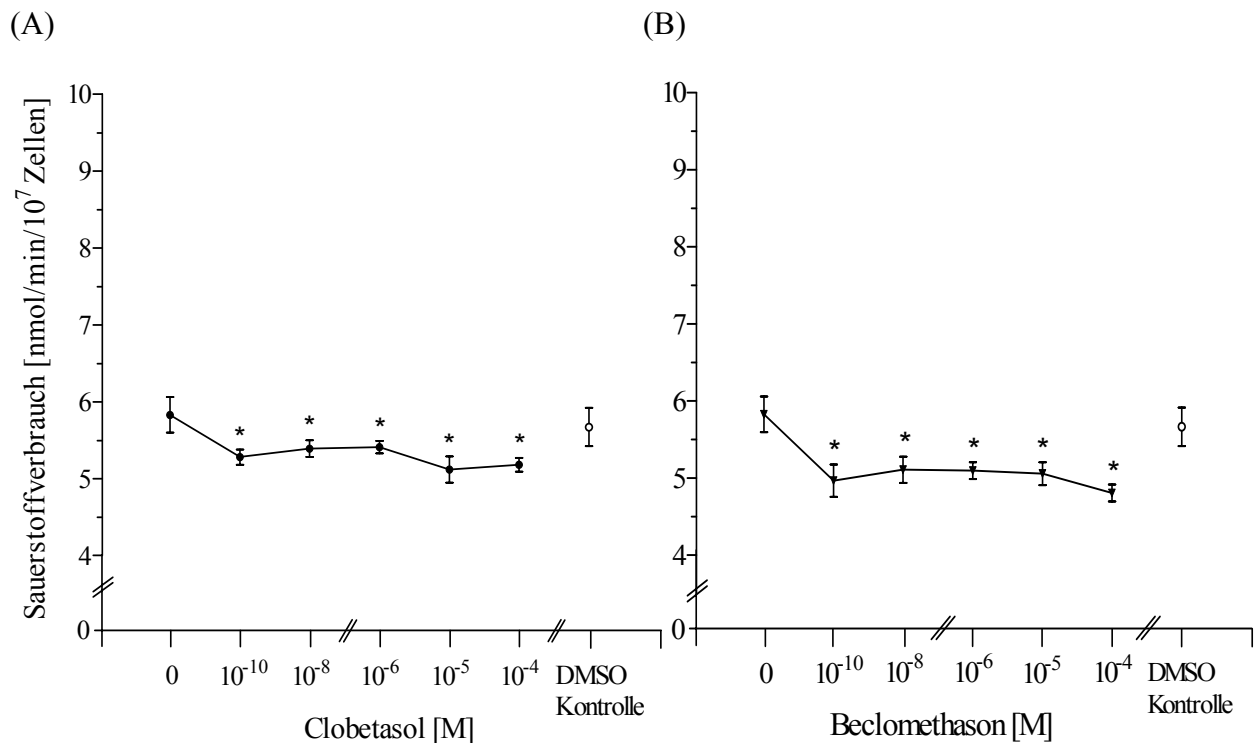


Abb. 13: Einfluss von Clobetasol (A) und Beclomethason (B) auf den Sauerstoffverbrauch von ruhenden humanen PBMC. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 7$. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

Die in den Abbildungen 12-13 dargestellten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die Zugabe von Dexamethason führte in allen Konzentration zu einer signifikanten Hemmung des Sauerstoffverbrauchs ruhender Lymphozyten. Dexamethason in einer Konzentration von 10^{-4} M hemmte den Sauerstoffverbrauch von $5,84 \pm 0,22$ nmol/min/ 10^7 Zellen auf $4,95 \pm 0,11$

nmol/min/ 10^7 Zellen ($p < 0,05$), was einer prozentualen Verminderung um $15,0 \% \pm 1,9 \%$ entsprach. Auch in den Konzentrationen von 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M und 10^{-10} M hemmte Dexamethason den Sauerstoffverbrauch ruhender PBMC signifikant ($p < 0,05$), und zwar um $14,4 \% \pm 1,7 \%$, $5,7 \% \pm 1,4 \%$, $5,7 \% \pm 1,6 \%$ bzw. $5,4 \% \pm 0,7 \%$.

Die Hemmwirkungen der untersuchten topischen Glucocorticoide waren im Gegensatz dazu nahezu konzentrationsunabhängig. So führte Clobetasol in der sehr niedrigen Konzentration von 10^{-10} M zu einer Hemmung des Sauerstoffverbrauchs um $9,5 \% \pm 1,7 \%$ auf $5,24 \pm 0,1$ nmol/min/ 10^7 Zellen ($p < 0,05$). Das Ausmaß der Atmungshemmung war dann bis 10^{-4} M annähernd unverändert (11,2 %). Einen ähnlichen Verlauf der Hemmeffekte wies Beclomethason auf, erreichte aber insgesamt ein etwas stärkeres Hemmniveau. Die

Konzentration von 10^{-10} M führte hier schon zu einer Hemmung des Sauerstoffverbrauchs um $13,6 \% \pm 3,6 \%$ auf $4,93 \pm 0,23$ nmol/min/ 10^7 Zellen ($p < 0,05$). 10^{-4} M hemmte um $17,4 \% \pm 2,4 \%$ auf $4,77 \pm 0,11$ nmol/min/ 10^7 Zellen ($p < 0,05$).

DMSO zeigte in der verwendeten Menge von 1 μ l keine signifikante Wirkung auf den Sauerstoffverbrauch. Nach Zugabe betrug dieser $5,67 \pm 0,25$ nmol/min/ 10^7 Zellen im Vergleich zur Basalatmung von $5,84 \pm 0,22$ nmol/min/ 10^7 Zellen.

Myxothiazol

Zur besseren Interpretation der für die verschiedenen Glucocorticoide gewonnenen Ergebnisse wurde vergleichend der Atmungskettenhemmstoff Myxothiazol untersucht (siehe 1.4). Beispielhaft wurden zwei Konzentrationen gewählt, die zu einer Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von ruhenden PBMC um 25 % bzw. 50 % führten. Nach Titrierung ergaben sich Konzentrationen von 14 μ M und 40 μ M.

Die Zugabe von 14 μ M Myxothiazol führte zu einer Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von $5,84 \pm 0,22$ nmol/min/ 10^7 Zellen auf $4,20 \pm 0,19$ nmol/min/ 10^7 Zellen und die Zugabe von 40 μ M zu einer Hemmung auf $3,01 \pm 0,43$ nmol/min/ 10^7 Zellen. Dies entsprach einer prozentualen Hemmung um $27,3 \% \pm 3,4 \%$ bzw. $47,9 \% \pm 7,4 \%$ (Abb. 14).

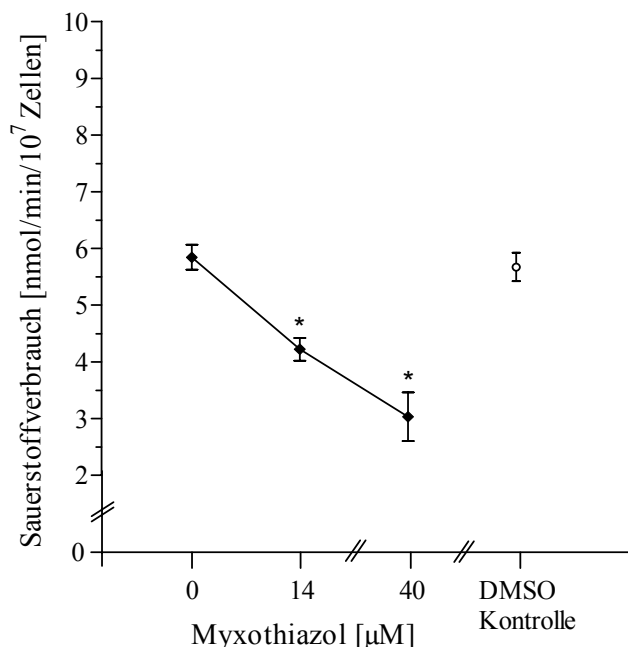


Abb. 14: Einfluss von Myxothiazol auf den Sauerstoffverbrauch von ruhenden humanen PBMC.

Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 6-7$.

* signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

3.1.3 Effekte von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol auf den Sauerstoffverbrauch von stimulierten PBMC

Zur Erfassung der glucocorticoid-induzierten Veränderungen des Energiestoffwechsels nach Aktivierung der PBMC wurden diese mit dem mitogenen Lektin Concanavalin A vorinkubiert. Con A wurde in einer Endkonzentration von 75 µg/ml eingesetzt. Bezogen auf die standardisierte Zellkonzentration von im Mittel $2,0 \times 10^7$ Zellen/ml Medium entsprach dies einer durchschnittlichen Zugabe von 3,75 µg Con A/ 10^6 Zellen. Diese Konzentration erwies sich nach Vorversuchen als optimal für die Stimulierung der humanen PBMC. Die Zugabe des zu untersuchenden Glucocorticoids erfolgte immer nach einer konstanten Inkubationszeit mit Con A von 3 min. Auch für stimulierte Zellen wurde eine Kontrolle von 1 µl DMSO mitgeführt. Die Abbildungen 15 und 16 zeigen die Effekte der drei Glucocorticoide Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason auf den Sauerstoffverbrauch der Con A-stimulierten Lymphozyten. Der Ausgangswert entspricht dem Sauerstoffverbrauch stimulierter Zellen.

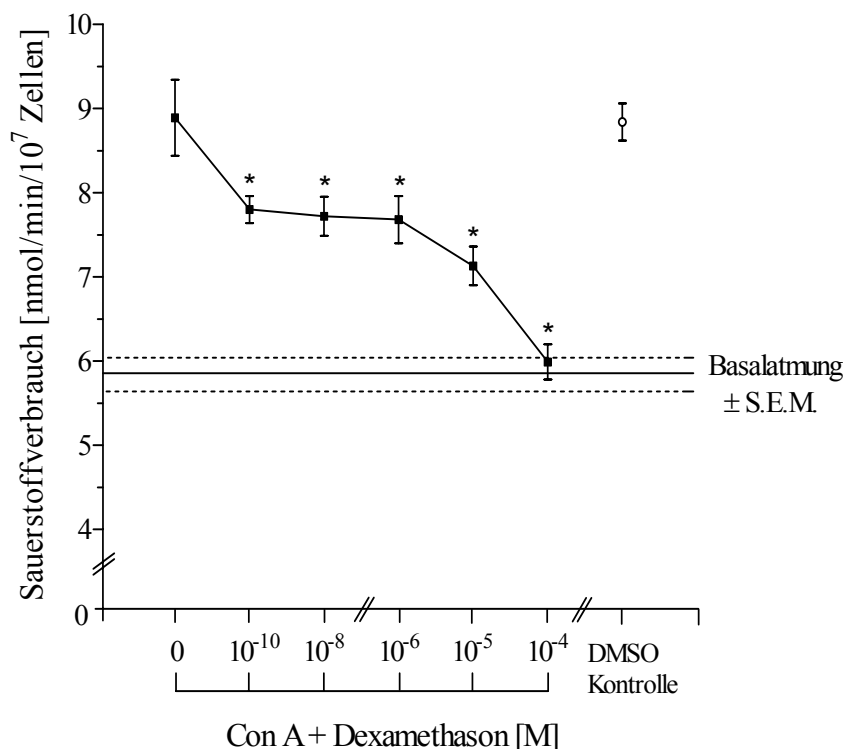


Abb. 15: Einfluss von Dexamethason auf den Sauerstoffverbrauch Con A-stimulierter humaner PBMC. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 6-8$. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

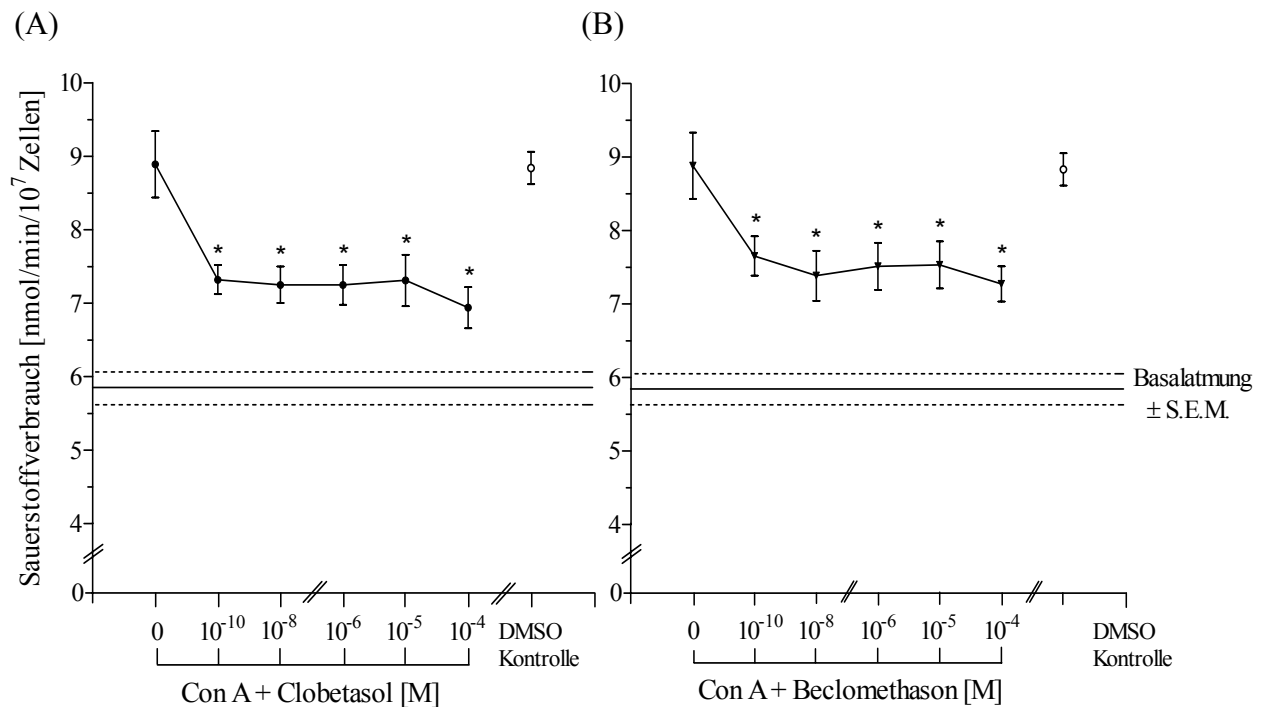


Abb. 16: Einfluss von Clobetasol (A) und Beclomethason (B) auf den Sauerstoffverbrauch Con A-stimulierter humaner PBMC. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 6-7$. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

Zusammenfassend lassen sich aus den Abbildungen 15–16 folgende Aussagen ableiten:

Die mitogene Stimulation der PBMC mit Con A führte zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs auf $8,89 \pm 0,45$ nmol/min/10⁷ Zellen. Dies entsprach einer prozentualen Steigerung gegenüber ruhenden Zellen von $55,4 \% \pm 4,6 \%$.

Nach Zugabe von Dexamethason kam es in allen Konzentrationen zu einer statistisch signifikanten, konzentrationsabhängigen Hemmung des Sauerstoffverbrauchs. 10⁻⁴ M zeigte eine absolute Hemmung auf $5,95 \pm 0,21$ nmol/min/10⁷ Zellen ($p < 0,05$), was einer prozentualen Differenz von $32,1 \% \pm 2,4 \%$ entsprach. 10⁻⁵ M führte zu einer Hemmung um $19,2 \% \pm 2,6 \%$ ($p < 0,05$). Ähnlich wie für ruhende Zellen unterschieden sich die Konzentrationen 10⁻⁶ M, 10⁻⁸ M und 10⁻¹⁰ M nicht voneinander. Sie zeigten eine Hemmung um $12,9 \% \pm 3,5 \%$ bzw. $12,5 \% \pm 2,8 \%$ bzw. $11,5 \% \pm 1,8 \%$ ($p < 0,05$).

Diese Konzentrationsabhängigkeit zeigte - wie schon für ruhende PBMC festgestellt - weder Clobetasol noch Beclomethason. Die Zugabe von Clobetasol führte bereits bei einer Konzentration von 10⁻¹⁰ M zu einem Abfall des Sauerstoffverbrauchs um $16,5 \% \pm 2,5 \%$ ($p < 0,05$). Dieses Hemmniveau blieb bis 10⁻⁴ M annähernd unverändert ($20,8 \% \pm 3,2 \%$).

Nahezu identisch dazu verhielt sich Beclomethason. Auch hier kam es nach Zugabe von 10^{-10} M zu einer maximalen Hemmung um $12,6 \% \pm 3,1 \%$ ($p < 0,05$). Diese Hemmung blieb bis 10^{-4} M annähernd konstant ($17,3 \% \pm 2,7 \%$).

Nach Zugabe von 1 μ l DMSO betrug der Sauerstoffverbrauch stimulierter Zellen $8,84 \pm 0,22$ nmol/min/ 10^7 Zellen. Damit ist auch der Effekt von DMSO auf den Sauerstoffverbrauch stimulierter PBMC nicht signifikant.

Myxothiazol

Abbildung 17 veranschaulicht den konzentrationsabhängigen Einfluss von Myxothiazol auf den Sauerstoffverbrauch Con A-stimulierter PBMC. Die Zugabe von 14 μ M führte zu einer signifikanten Hemmung des Sauerstoffverbrauchs in Con A-stimulierten PBMC auf $5,85 \pm 0,45$ nmol/min/ 10^7 Zellen ($p < 0,05$), entsprechend $33,2 \% \pm 5,1 \%$. Myxothiazol in einer Konzentration von 40 μ M hemmte statistisch signifikant um 54,2 % auf $4,01 \pm 0,33$ nmol/min/ 10^7 Zellen ($p < 0,05$).

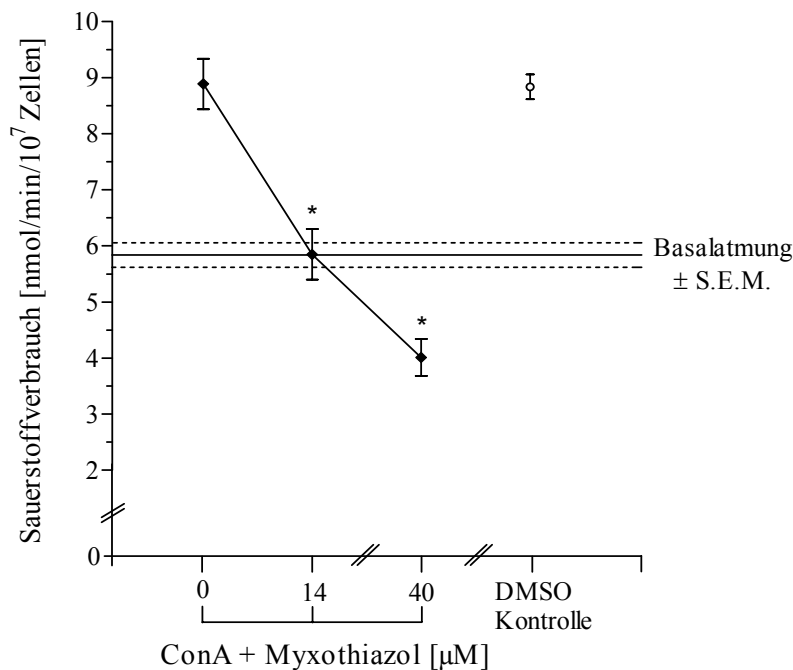


Abb. 17: Einfluss von Myxothiazol auf den Sauerstoffverbrauch Con A-stimulierter humaner PBMC. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 6-7$. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

3.1.4 Effekte der Con A-Stimulation auf den Sauerstoffverbrauch von humanen PBMC nach Vorinkubation mit Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol

In den unter 3.1.2. und 3.1.3. dargestellten Untersuchungen wurde der Einfluss der Glucocorticoide auf ruhende bzw. stimulierte PBMC analysiert. In weiteren Experimenten sollte der Glucocorticoideffekt auf die Stimulierbarkeit der Zellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden aus buffy coats präparierte Zellsuspensionen zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason für 4 min vorinkubiert. Die Zellen wurden dann mit $3,75 \mu\text{g Con A}/10^6$ Zellen stimuliert, es erfolgte die Messung des Sauerstoffverbrauchs. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm S.E.M. (n = Zahl der Experimente) angegeben. Zum Vergleich ist jeweils der Con A–stimulierte Sauerstoffverbrauch von unbehandelten PBMC (vgl. 3.1.3.) angegeben.

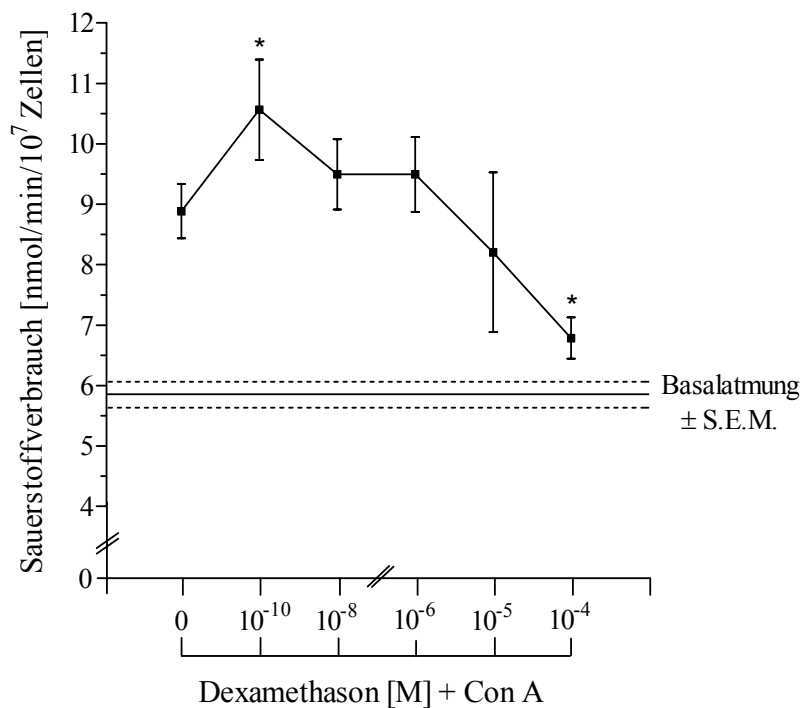


Abb. 18: Stimulierbarkeit des Sauerstoffverbrauchs humaner PBMC mit Con A ohne Glucocorticoide bzw. in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Dexamethason. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 6-9$. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

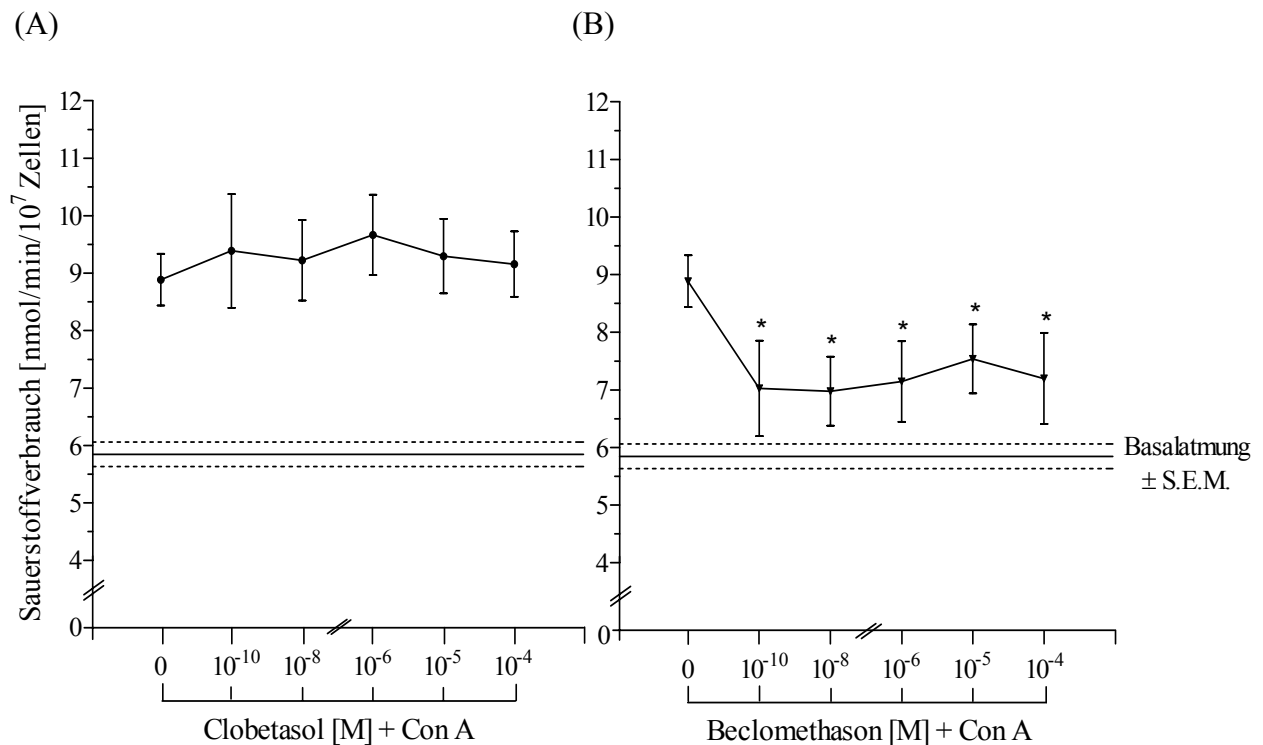


Abb. 19: Stimulierbarkeit des Sauerstoffverbrauchs humaner PBMC mit Con A ohne Glucocorticoide bzw. in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Clobetasol (A) oder Beclomethason (B). Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 5-7$. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

Wie aus Abbildung 18 zu entnehmen ist, war die Stimulierbarkeit der Zellen nur bei der höchsten Konzentration von Dexamethason (10^{-4} M) signifikant reduziert und lag bei $6,79 \pm 0,34$ nmol/min/ 10^7 Zellen ($p < 0,05$). Verglichen mit der Kontrolle entsprach dies einer Reduktion um $22,5 \% \pm 3,8 \%$ ($p < 0,05$). Durch Konzentrationen von 10^{-5} M bis 10^{-8} M wurde die Stimulierbarkeit nicht signifikant beeinflusst. Die PBMC waren nach Zugabe von Dexamethason in einer Konzentration von 10^{-10} M signifikant stimulierbar. Die Zugabe von Con A führte hier zu einer Steigerung des Sauerstoffverbrauchs auf $10,57 \pm 0,83$ nmol/min/ 10^7 Zellen, was einer prozentualen Zunahme von $19,7 \% \pm 9,4 \%$ entsprach ($p < 0,05$).

Im Gegensatz dazu rief Clobetasol in allen Konzentrationen keine Änderung der Stimulierbarkeit hervor (Abb. 19 A). Es kam bei allen Konzentrationen zu einem leichten, aber statistisch nicht signifikanten Anstieg der Stimulierbarkeit. Sie stieg nach Zugabe von 10^{-4} M um $4,5 \%$ auf $9,16 \pm 0,57$ nmol/min/ 10^7 Zellen ($p > 0,05$).

Beclomethason führte in allen Konzentrationen (10^{-10} M bis 10^{-4} M) zu einer signifikanten Verminderung der Stimulierbarkeit (Abb. 19 B). Dieser Effekt war konzentrationsunabhängig und entsprach im Mittel einer Reduktion um 18 %.

Myxothiazol

Abbildung 20 stellt den Einfluss von Myxothiazol auf die Stimulierbarkeit humaner PBMC dar. Die Zugabe von Myxothiazol führte zu einer statistisch signifikanten Verminderung der Stimulierbarkeit. In Anwesenheit von 14 μ M Myxothiazol waren die Zellen nur noch auf $5,88 \pm 1,09$ nmol/min/ 10^7 Zellen ($p < 0,05$) stimulierbar, was bezogen auf die Ausgangsstimulation von $8,89 \pm 0,45$ nmol/min/ 10^7 Zellen einer prozentualen Hemmung um 32,9 % entsprach. Nach Zugabe von 40 μ M Myxothiazol waren die Zellen nur noch auf $3,56 \pm 1,25$ nmol/min/ 10^7 Zellen ($p < 0,05$) stimulierbar. Dies entsprach einer prozentualen Hemmung um 59,4 %.

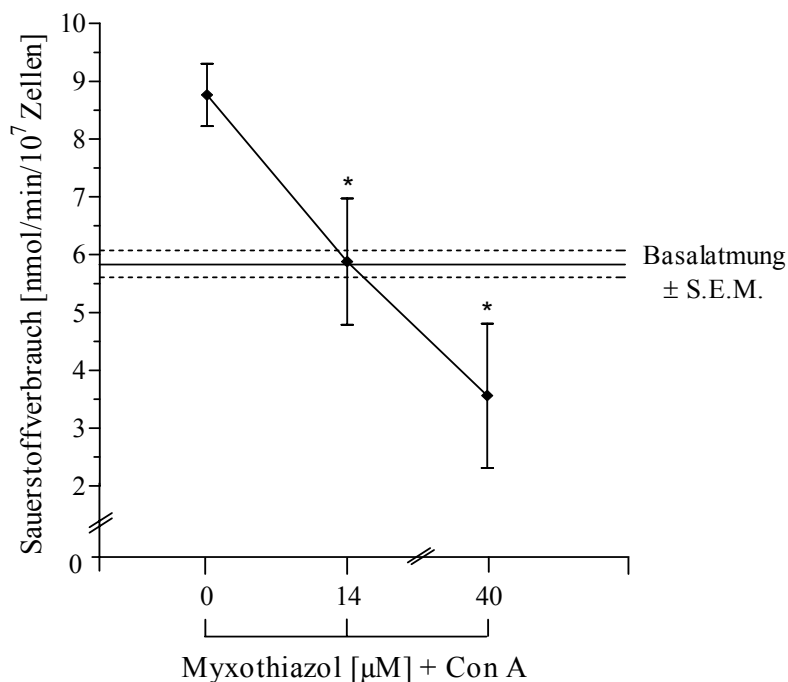


Abb. 20: Stimulierbarkeit des Sauerstoffverbrauchs humaner PBMC mit Con A ohne bzw. in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Myxothiazol. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 6-7$. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

3.1.5 Zusammenfassung

Dexamethason

Dexamethason hemmt sowohl in ruhenden als auch in Con A-stimulierten PBMC den Sauerstoffverbrauch konzentrationsabhängig.

1. In ruhenden Zellen werden prozentuale Hemmeffekte von 6 % (10^{-8} M und 10^{-6} M) bis 15 % (10^{-5} M und 10^{-4} M) erreicht.
2. In stimulierten Zellen sind die Hemmeffekte stärker ausgeprägt. Hier rufen Konzentrationen von 10^{-8} M bzw. 10^{-6} M Hemmungen um etwa 13 % hervor, während es durch 10^{-4} M zu einer etwa 32%igen Hemmung kommt.
3. Die Stimulierbarkeit wird durch Dexamethason nur in einer Konzentration von 10^{-4} M signifikant reduziert.

Clobetasol

Die Effekte von Clobetasol auf den Sauerstoffverbrauch in PBMC weichen von den für Dexamethason beschriebenen Effekten deutlich ab. Clobetasol hemmt in ruhenden wie in Con A-stimulierten Zellen den Sauerstoffverbrauch deutlich, aber konzentrationsunabhängig.

1. In ruhenden Zellen wird der Sauerstoffverbrauch von 10^{-10} M bis 10^{-4} M statistisch signifikant um 9,5 % (10^{-10} M) bis 11 % (10^{-4} M) gehemmt. Damit erreicht Clobetasol in ruhenden Zellen nicht die Hemmstärke von Dexamethason (15 % bei 10^{-4} M).
2. In stimulierten Zellen ist die Hemmung auch konzentrationsunabhängig und stärker ausgeprägt. Hier werden Hemmeffekte von etwa 17 % (10^{-10} M bis 10^{-5} M) bis 20 % (10^{-4} M) erreicht.
3. Die Stimulierbarkeit der Zellen wird durch keine der Konzentrationen von Clobetasol reduziert. Im Gegensatz dazu kommt es zu einem geringgradigen, aber nicht signifikanten Anstieg der Stimulierbarkeit.

Beclomethason

Beclomethason führt sowohl in ruhenden als auch in stimulierten PBMC zu einem konzentrationsunabhängigen Hemmeffekt auf die Zellatmung. Damit unterscheidet es sich in gleicher Weise wie Clobetasol von Dexamethason.

1. In ruhenden Zellen rufen alle Konzentrationen (10^{-4} M bis 10^{-10} M) einen signifikanten Hemmeffekt von etwa 14 % hervor.
2. In stimulierten Zellen führt Beclomethason zu einer konzentrationsunabhängigen Atmungshemmung, die bei Konzentrationen zwischen 10^{-4} M bis 10^{-10} M etwa 15 % beträgt.
3. Beclomethason reduziert in allen Konzentrationen die Stimulierbarkeit konstant um etwa 18 %. Es wird aber nicht das Niveau des basalen Sauerstoffverbrauchs erreicht.

Myxothiazol

Die gemessenen Effekte von Myxothiazol auf den Sauerstoffverbrauch in PBMC zeigen in ruhenden wie in Con A-stimulierten Zellen eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit.

1. In ruhenden Zellen wird die Atmung um etwa 27 % (14 μ M) bis 33 % (40 μ M) gehemmt.
2. Bei beiden Konzentrationen sind die Hemmeffekte in stimulierten Zellen stärker ausgeprägt. Sie erreichen prozentuale Hemmungen von 48 % (14 μ M) bis 54 % (40 μ M).
3. Die Stimulierbarkeit wird durch beide Konzentrationen deutlich und statistisch signifikant herabgesetzt. Die Reduktion liegt bei 33 % (14 μ M) bzw. 59 % (40 μ M).

Ein zusammenfassender Vergleich der drei Glucocorticoide führt demnach zu folgenden Aussagen:

- I. In ruhenden und stimulierten PBMC hemmt Dexamethason den Sauerstoffverbrauch *konzentrationsabhängig*. Im Gegensatz dazu hemmen die beiden topischen Glucocorticoide Clobetasol und Beclomethason in ruhenden und in stimulierten Zellen *konzentrationsunabhängig*.
- II. In stimulierten PBMC sind die Hemmeffekte von Dexamethason und Clobetasol deutlich stärker ausgeprägt als in ruhenden Zellen. Der Hemmeffekt von Beclomethason unterscheidet sich in stimulierten und in ruhenden Zellen nicht.
- III. Topische Glucocorticoide sind hinsichtlich ihres Hemmeffektes auf den zellulären Energiestoffwechsel in niedrigen Konzentrationen *potenter* und in hohen Konzentrationen *weniger potent* als Dexamethason.
- IV. In ihrem Verhalten auf die Stimulierbarkeit der Zellen unterscheiden sich alle drei Glucocorticoide untereinander: Dexamethason hemmt die Stimulierbarkeit nur bei 10^{-4} M.

Clobetasol hat keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Stimulierbarkeit.
Beclomethason hemmt die Stimulierbarkeit konstant in allen Konzentrationen.

3.2 Quantitative Bestimmung von IL-6 mittels nichtkompetitivem ELISA

3.2.1 IL-6-Synthese von ruhenden und stimulierten PBMC

Abbildung 21 zeigt die basale IL-6-Synthese ruhender PBMC im Vergleich zur IL-6-Synthese nach mitogener Stimulation mit 5 $\mu\text{g/ml}/10^6$ Zellen Con A bzw. 10 $\mu\text{g/ml}/10^6$ Zellen PHA. Die IL-6-Synthese ruhender PBMC lag bei $9,26 \pm 2,53$ pg/ml. Die mitogene Stimulation mit PHA und Con A führte unter beiden Bedingungen zu einer signifikanten Steigerung der IL-6-Synthese auf $2494,5 \pm 496,9$ pg/ml/ 10^6 Zellen ($p = 0,015$) bzw. $3434,1 \pm 818,3$ pg/ml/ 10^6 Zellen ($p = 0,02$).

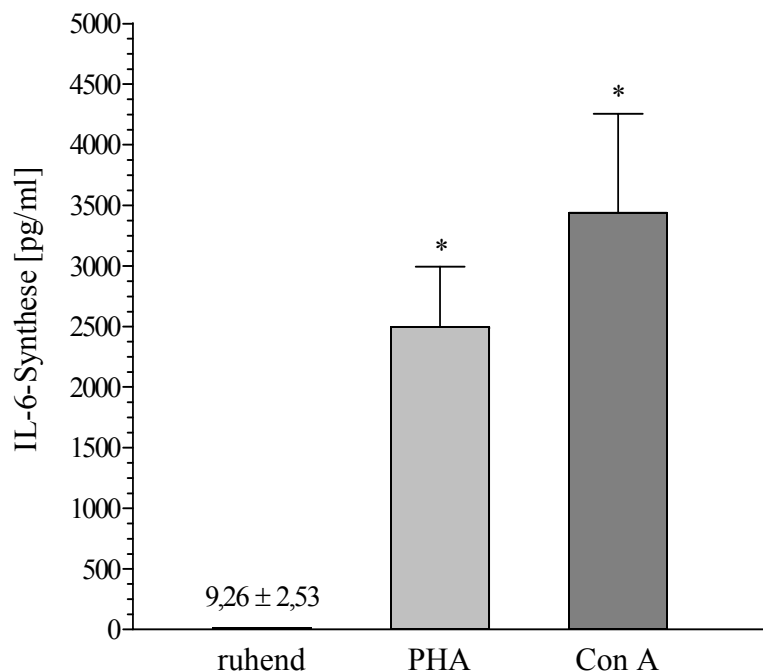


Abb. 21: IL-6-Synthese ruhender PBMC verglichen mit der IL-6-Synthese nach Stimulation mit 10 $\mu\text{g/ml}/10^6$ Zellen PHA bzw. 5 $\mu\text{g/ml}/10^6$ Zellen Con A. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 6$ für ruhende PBMC und $n = 4$ für stimulierte PBMC. *signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p \leq 0,02$).

3.2.2 Effekte von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol auf die IL-6- Synthese von ruhenden PBMC

Um den Einfluss der Glucocorticoide auf die IL-6- Synthese ruhender PBMC zu untersuchen, wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason für 24 h inkubiert. Als Negativkontrolle diente die basale IL-6-Synthese der Zellen ohne Glucocorticoidzusatz. Wie unter 2.3.2. beschrieben wurde der Zellüberstand gewonnen und zur Messung der IL-6-Synthese verwendet. Die Auswertung erfolgte stets als Doppelwertbestimmung aus zwei Proben. Die gewonnenen Ergebnisse sind in den Abbildungen 22 und 23 dargestellt.

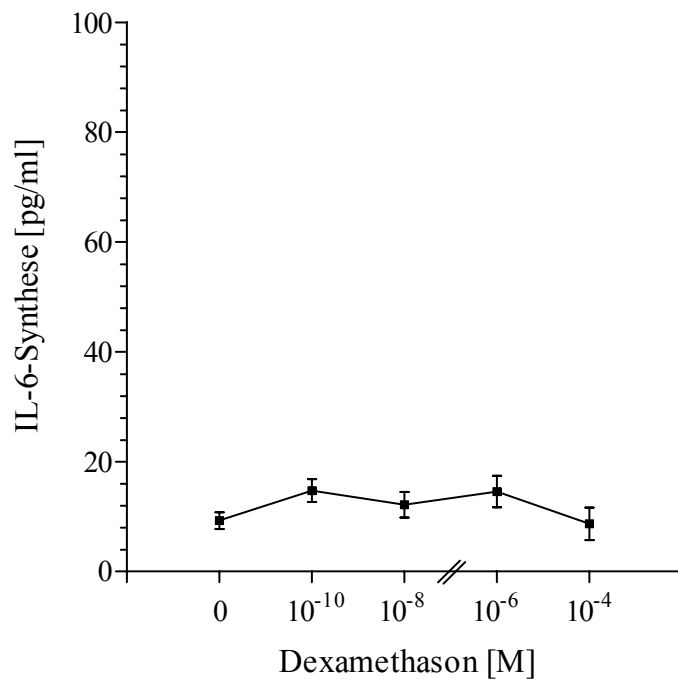


Abb. 22: Einfluss von Dexamethason auf die IL-6-Synthese ruhender humaner PBMC. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 4$.

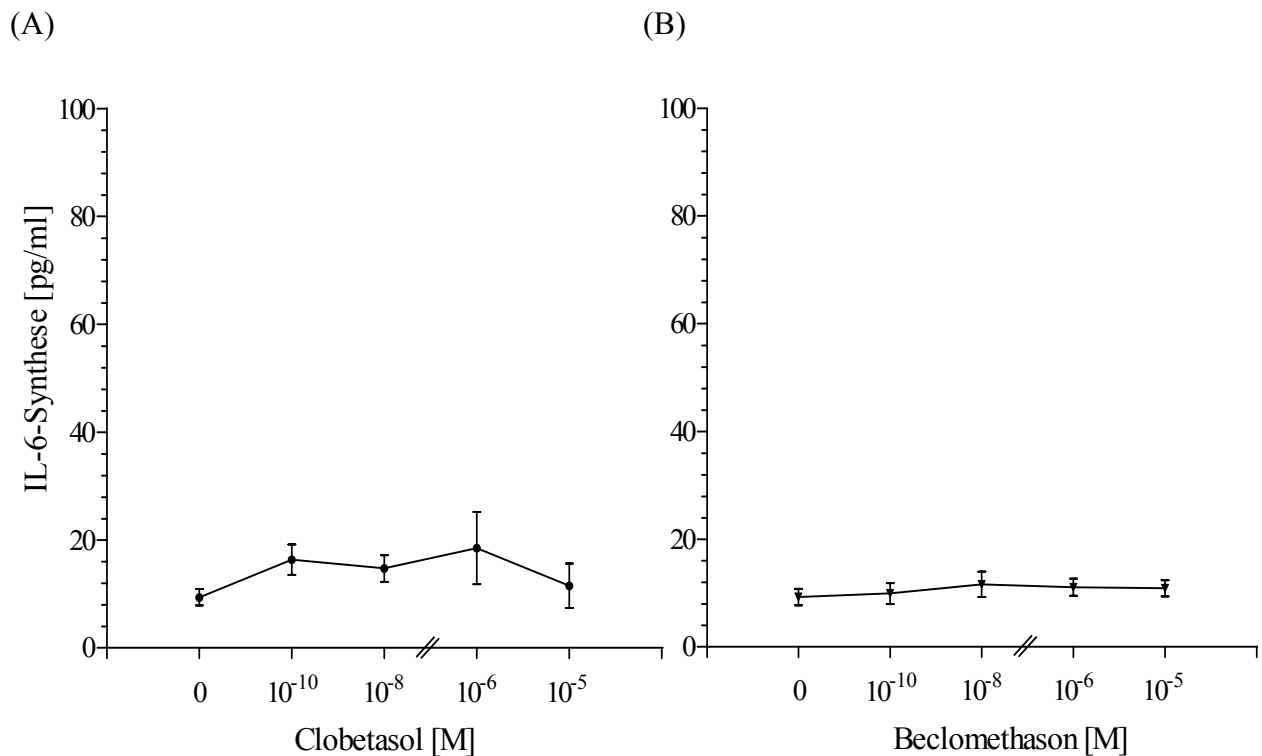


Abb. 23: Einfluss von Clobetasol (A) und Beclomethason (B) auf die IL-6-Synthese ruhender humaner PBMC. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 3-4$.

Wie die Abbildungen 22-23 zeigen, führte keines der drei Glucocorticoide in ruhenden Zellen zu einer signifikanten Beeinflussung der IL-6-Synthese. Diese betrug nach Zugabe von Dexamethason 10^{-4} M $8,7 \pm 3,0$ pg/ml/ 10^6 Zellen ($p = 0,4$), nach Zugabe von Clobetasol 10^{-5} M $11,5 \pm 4,1$ pg/ml/ 10^6 Zellen ($p = 0,6$) und nach Zugabe von Beclomethason 10^{-5} M $10,9 \pm 1,52$ pg/ml/ 10^6 Zellen ($p = 0,5$).

Myxothiazol

Nachdem bei den Untersuchungen der Glucocorticoideffekte auf den Sauerstoffverbrauch der Vergleich zu Myxothiazol als einen bekannten Hemmstoff der Atmungskette hergestellt wurde (siehe 3.1), interessierte nun das Verhalten von Myxothiazol auf die Interleukin-Produktion peripherer Lymphozyten. Dazu wurden analog zu den Sauerstoffexperimenten die gleichen Konzentrationen von 14 μ M und 40 μ M benutzt.

Aus Abbildung 24 wird deutlich, dass der Einfluss von Myxothiazol auf die IL-6-Synthese ruhender PBMC nicht den gleichen konzentrationsabhängigen Effekt hatte, wie auf den

Sauerstoffverbrauch ruhender PBMC (siehe 3.1.2). Ähnlich zu den beschriebenen Glucocorticoideffekten zeigte sich kein signifikanter Effekt von Myxothiazol auf die Interleukin-Synthese. Die IL-6-Synthese nach Zugabe von 40 μM Myxothiazol betrug $17,4 \pm 7,2 \text{ pg/ml/10}^6$ Zellen ($p = 0,4$) und nach Zugabe von 14 μM $20,6 \pm 9,0 \text{ pg/ml/10}^6$ Zellen ($p = 0,3$).

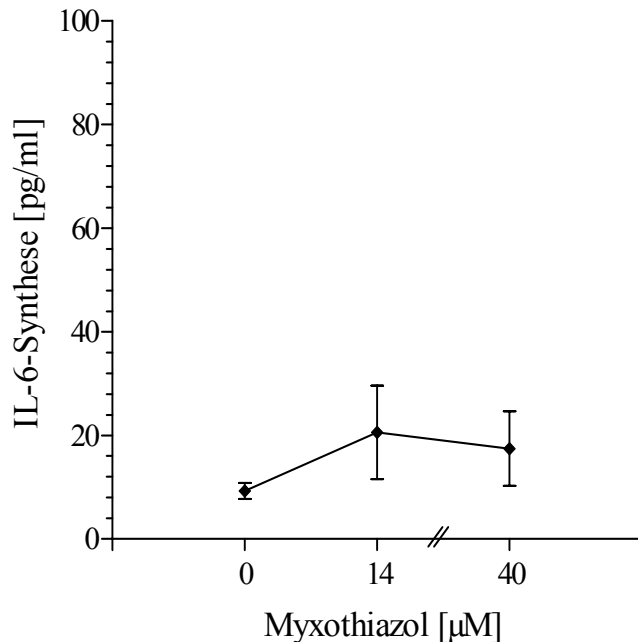


Abb. 24: Einfluss von Myxothiazol auf die IL-6-Synthese ruhender humaner PBMC. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 3-4$.

3.2.3 Effekte von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol auf die IL-6-Synthese von PHA-stimulierten PBMC

Im Weiteren sollte die Wirkung von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason auf mitogen stimulierte Zellen untersucht werden. Dazu wurden die PBMC mit dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) in einer Endkonzentration von $10 \mu\text{l/ml/10}^6$ Zellen für 24 h präinkubiert. Die Stimulation führte zu einer signifikanten Steigerung der IL-6-Synthese (siehe 3.2.1.). Die Glucocorticoide wurden dann analog den Experimenten mit ruhenden Zellen in ansteigenden Konzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-4} M bzw. 10^{-5} M zugegeben.

Die Abbildungen 25 und 26 stellen die Wirkungen der Glucocorticoide auf die Interleukin-Synthese der stimulierten Lymphozyten dar. Der Ausgangswert entspricht dabei der IL-6-Synthese PHA-stimulierter Zellen ohne Glucocorticoidzugabe.

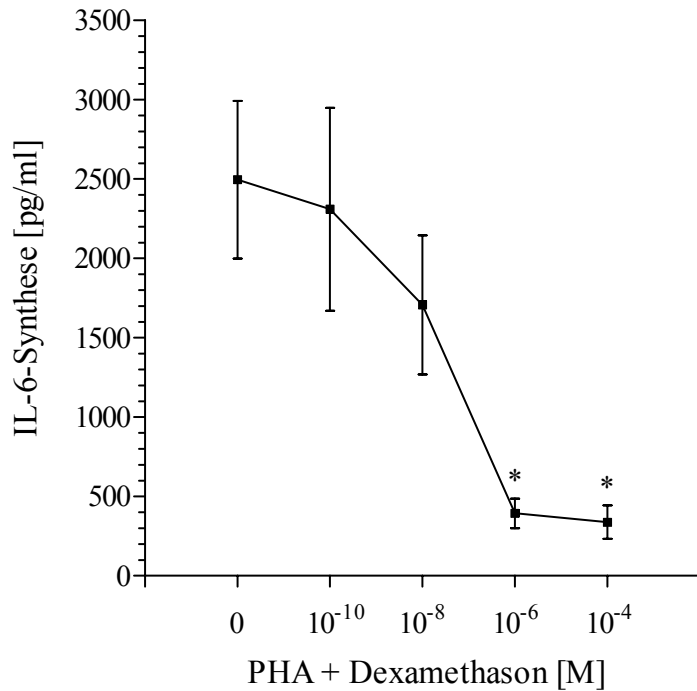


Abb. 25: Einfluss von Dexamethason auf die IL-6-Synthese PHA-stimulierter humaner PBMC. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 3-4$. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

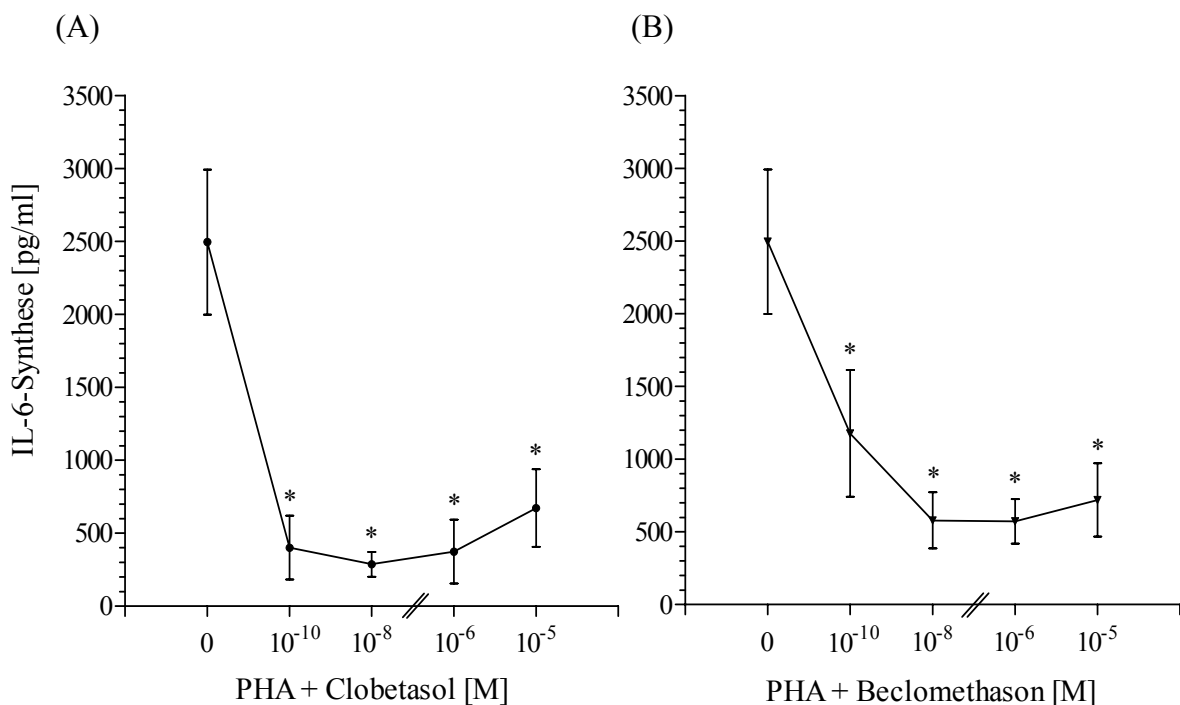


Abb. 26: Einfluss von Clobetasol (A) und Beclomethason (B) auf die IL-6-Synthese PHA-stimulierter humaner PBMC. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 3$. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

Aus den Abbildungen 25-26 ergeben sich für die IL-6-Synthese PHA-stimulierter humaner peripherer Lymphozyten folgende Aussagen:

Die mitogene Stimulation humaner PBMC mit PHA in einer Endkonzentration von $10\ \mu\text{g/ml}/10^6$ Zellen führte zu einer signifikanten Stimulation der Interleukin-Produktion von basal $9,3 \pm 1,5\ \text{pg/ml}/10^6$ Zellen auf $2494,5 \pm 496,9\ \text{pg/ml}/10^6$ Zellen ($p = 0,02$).

Die Zugabe von Dexamethason in Konzentrationen von $10^{-4}\ \text{M}$ bis $10^{-10}\ \text{M}$ führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduzierung der IL-6-Synthese der PBMC. Dabei kam es nur bei Zugabe von $10^{-4}\ \text{M}$ und $10^{-6}\ \text{M}$ zu einer statistisch signifikanten Hemmung und zwar um $86,4\ \% \pm 6,1\ \%$ auf einen Absolutwert von $338,3 \pm 105,9\ \text{pg/ml}/10^6$ Zellen ($p = 0,03$) bzw. $84,2\ \% \pm 0,2\ \%$ auf $393,2 \pm 92,6\ \text{pg/ml}/10^6$ Zellen ($p = 0,02$). Bei $10^{-8}\ \text{M}$ und $10^{-10}\ \text{M}$ war die IL-6-Synthese tendenziell, aber nicht statistisch signifikant vermindert.

Im Gegensatz dazu stellte sich für Clobetasol eine von Dexamethason völlig abweichende Kinetik dar. Bereits die Zugabe von $10^{-10}\ \text{M}$ Clobetasol führte zu einer signifikanten Hemmung der IL-6-Synthese um $83,9\ \% \pm 0,8\ \%$ auf absolut $400,9 \pm 217,9\ \text{pg/ml}/10^6$ Zellen ($p = 0,02$). Alle eingesetzten Konzentrationen hemmten statistisch signifikant im Mittel um $80\ \%$.

Auch für Beclomethason wurde gefunden, dass es bereits bei einer Zugabe von $10^{-10}\ \text{M}$ Beclomethason zu einer deutlichen Hemmung der IL-6-Synthese um $52,8\ \% \pm 0,9\ \%$ auf $1176,7 \pm 435,5\ \text{pg/ml}/10^6$ Zellen ($p = 0,8$) kam. Die Zugabe von $10^{-8}\ \text{M}$, $10^{-6}\ \text{M}$ bzw. $10^{-5}\ \text{M}$ führte zu einer statistisch signifikanten Hemmung der IL-6-Synthese und zwar von im Mittel $75\ \% \pm 0,5\ \%$ auf $578,6 \pm 193,2\ \text{pg/ml}/10^6$ Zellen bei $10^{-8}\ \text{M}$ ($p < 0,05$), auf $572,3 \pm 152,4\ \text{pg/ml}/10^6$ Zellen bei $10^{-6}\ \text{M}$ ($p < 0,05$) bzw. auf $718,9 \pm 251,4\ \text{pg/ml}/10^6$ Zellen bei $10^{-5}\ \text{M}$.

Myxothiazol

Im Gegensatz zu den für ruhende PBMC gefundenen Ergebnissen führte die Zugabe des Atmungskettenhemmstoffs zu Con A- bzw. PHA-stimulierten Zellen zu einer ausgeprägten und statistisch signifikanten Hemmung der IL-6-Synthese. Die Kinetik dieser Hemmung stellte sich in diesen Konzentrationsbereichen als nahezu konzentrationsunabhängig dar.

So betrug die IL-6-Synthese nach Zugabe von $40\ \mu\text{M}$ Myxothiazol auf PHA-stimulierte humane PBMC noch $699,72 \pm 251,5\ \text{pg/ml}/10^6$ Zellen ($p = 0,02$), was verglichen mit dem Kontrollwert einer Verminderung um $71,9\ \% \pm 1,1\ \%$ entsprach. Auch bereits $14\ \mu\text{M}$ Myxothiazol reduzierte die IL-6-Synthese signifikant um $68,1\ \% \pm 2,5\ \%$ ($p = 0,02$) und wich damit nicht signifikant von

der Hemmung ab, die für 40 μM Myxothiazol gefunden wurde. Abbildung 27 veranschaulicht die für Myxothiazol bei PHA-stimulierten PBMC gefundenen Ergebnisse.

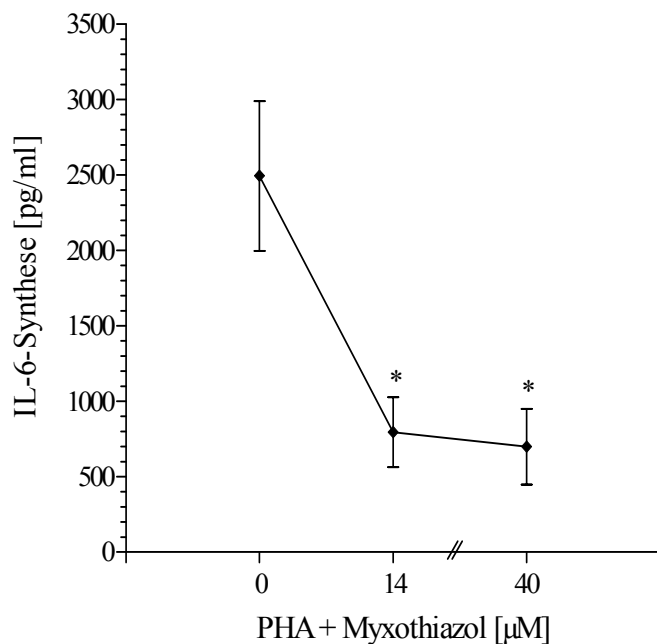


Abb. 27: Einfluss von Myxothiazol auf die IL-6-Synthese PHA-stimulierter humaner PBMC. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 3$. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

3.2.4 Effekte von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol auf die IL-6-Synthese von Con A-stimulierten PBMC

Neben der PHA-Stimulierung stellt die Stimulierung mit Con A ein weiteres etabliertes System zur mitogenen Stimulation peripherer T-Lymphozyten dar. Es wurde bereits zur Stimulierung der PBMC für die Experimente zum Sauerstoffverbrauch verwendet. Aus diesen Gründen sollte die Stimulation mit Con A als Vergleich zu den gefundenen Werten für die PHA-stimulierten Zellen dienen. Die PBMC wurden mit Con A in einer Endkonzentration von $5 \mu\text{g/ml}/10^6$ Zellen vorinkubiert. Die Stimulation führte zu einer signifikanten Steigerung der IL-6-Synthese (siehe 3.2.1.). Die Glucocorticoide Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason wurden dann in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Abbildungen 28-29 dargestellt.

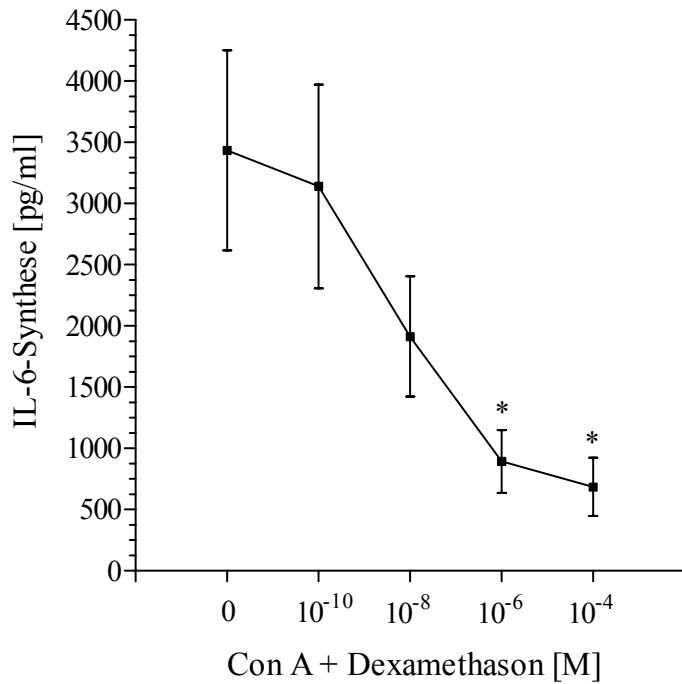


Abb. 28: Einfluss von Dexamethason auf die IL-6-Synthese Con A-stimulierter humaner PBMC.

Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug n = 3-4.

* signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

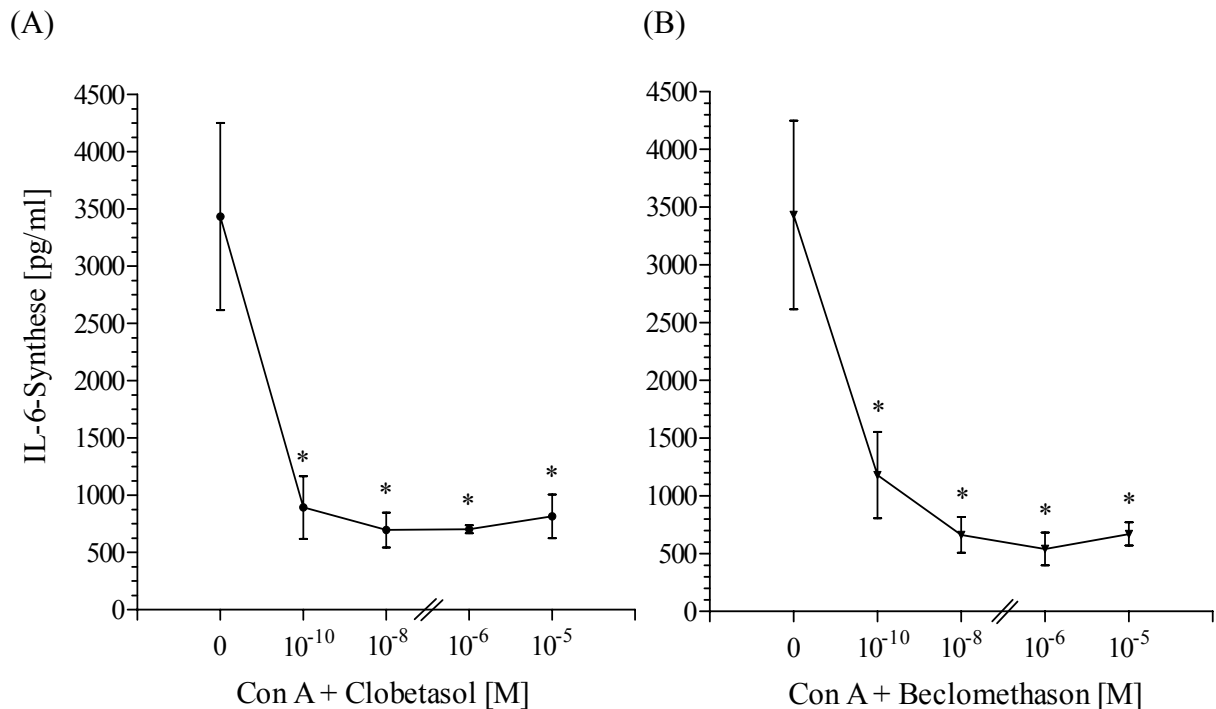


Abb. 29: Einfluss von Clobetasol (A) und Beclomethason (B) auf die IL-6-Synthese Con A-

stimulierter humaner PBMC. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der

Experimente betrug n = 3. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

Wie die Abbildungen 28-29 zeigen, finden sich die für die PHA-Stimulation gefundenen Werte durch die Con A-Experimente weitestgehend bestätigt. Es lassen sich folgende Aussagen treffen:

Die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmeffekte von Dexamethason auf die IL-6-Synthese mitogen stimulierter PBMC wurde bestätigt. Auch die prozentualen Hemmwerte in Con A-stimulierten Zellen entsprachen annähernd denen der PHA-stimulierten Zellen. So wurde die IL-6-Synthese nach Zugabe von 10^{-4} M und 10^{-6} M Dexamethason statistisch signifikant vermindert und zwar auf $684,8 \pm 238,2$ pg/ml/ 10^6 Zellen ($80,1 \% \pm 4,1 \%$, $p = 0,03$) bzw. auf $893,0 \pm 256,9$ pg/ml/ 10^6 Zellen ($74,0 \% \pm 4,2 \%$, $p = 0,02$). Mit abnehmender Konzentration näherten sich die Werte dem Ausgangswert bis auf $3140,46 \pm 832,0$ pg/ml/ 10^6 Zellen ($8,6 \% \pm 5,1 \%$, $p = 0,16$) an (vgl. $7,5 \% \pm 5,1 \%$ für PHA-stimulierte Zellen).

Die beiden topischen Glucocorticoide Clobetasol und Beclomethason wiesen ein nahezu identisches Verhalten hinsichtlich ihrer Wirkung auf die IL-6-Synthese Con A-stimulierter Zellen auf. So kam es sofort nach Zugabe von 10^{-10} M zu einer statistisch signifikanten Hemmung der Interleukin-Produktion. Diese betrug für Clobetasol in dieser Konzentration $74,0 \% \pm 18,9 \%$ ($p < 0,05$) und für Beclomethason $65,6 \% \pm 22,3 \%$ ($p < 0,05$). Für beide Glucocorticoide war im folgenden eine konzentrationsunabhängige Hemmwirkung festzustellen. Sie betrug für Clobetasol in einer Konzentration von 10^{-8} M $79,7 \% \pm 10,5 \%$ ($p = 0,04$) und für Beclomethason in gleicher Konzentration $80,7 \% \pm 11,4 \%$ ($p = 0,04$). Diese für eine Konzentration von 10^{-8} M gefundenen Werte blieben auch in Anwesenheit von 10^{-6} M bis 10^{-5} M unverändert bei im Mittel 80 %.

Myxothiazol

Auch für Myxothiazol wurden die für PHA-stimulierte PBMC gefundenen Ergebnisse durch die Con A-Stimulation bestätigt. Beide Konzentrationen (14 μ M und 40 μ M) hemmten die IL-6-Synthese Con A-stimulierter humaner PBMC signifikant und in diesen Konzentrationsbereichen nahezu konzentrationsunabhängig. Somit betrug die Interleukin-Produktion in Anwesenheit von 40 μ M noch $590,7 \pm 188,5$ pg/ml/ 10^6 Zellen ($p = 0,02$) und in Anwesenheit von 14 μ M $736,2 \pm 191,9$ pg/ml/ 10^6 Zellen ($p = 0,02$). Dies entsprach einer prozentualen Hemmung um $82,8 \% \pm 8,9 \%$ bzw. um $78,6 \% \pm 11,3 \%$ (Abb. 30).

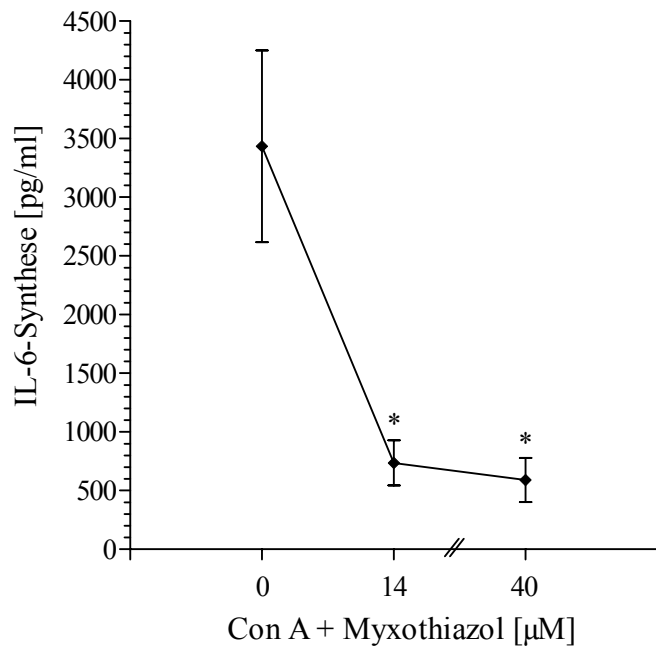


Abb. 30: Einfluss von Myxothiazol auf die IL-6-Synthese Con A-stimulierter humaner PBMC. Angegeben sind Mittelwerte und S.E.M. Die Anzahl der Experimente betrug n = 3-4. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

3.2.5 Zusammenfassung

Dexamethason

Das systemisch wirksame Dexamethason hat keinen Einfluss auf die IL-6-Synthese ruhender humaner PBMC, weist aber einen deutlichen und konzentrationsabhängigen Effekt auf die stimulierte IL-6-Synthese (Con A bzw. PHA) auf.

1. In PHA-stimulierten PBMC hemmt Dexamethason 10^{-8} M die IL-6-Synthese tendenziell, Konzentrationen zwischen 10^{-6} M und 10^{-4} M dagegen statistisch signifikant - im Mittel um 85 %.
2. In Con A-stimulierten PBMC vermindert Dexamethason die IL-6-Synthese konzentrationsabhängig. Konzentrationen von 10^{-6} M bzw. 10^{-4} M hemmen statistisch signifikant Hemmungen um 74 % bzw. 80 %.

Clobetasol

Clobetasol hat keinen Einfluss auf die IL-6-Synthese ruhender PBMC. Es hemmt deutlich und konzentrationsunabhängig die IL-6-Synthese in PHA- und Con A-stimulierten Zellen und weicht somit deutlich von den für Dexamethason beschriebenen Ergebnissen ab.

1. In PHA-stimulierten Zellen rufen alle Konzentrationen (10^{-10} M bis 10^{-5} M) eine signifikante Hemmung der IL-6-Synthese von 73,1 % (10^{-5} M) bis 88,5 % (10^{-8} M) hervor.
2. Das Hemmverhalten von Clobetasol nach Vorinkubation mit Con A entspricht weitestgehend dem nach Vorinkubation mit PHA. Es werden konstante Hemmungen zwischen 74 % (10^{-10} M) und 79 % (10^{-5} M bis 10^{-8} M) erreicht. Somit ist durch Con A Stimulation das Hemmausmaß und die Konzentrationsunabhängigkeit der PHA-stimulierten Werte bestätigt.

Beclomethason

Die Effekte der beiden topischen Glucocorticoide waren sowohl in ruhenden als auch stimulierten PBMC nahezu identisch. In ruhenden PBMC hat Beclomethason keine Wirkung auf die IL-6-Synthese, in PHA- und Con A-stimulierten Zellen kommt es aber zu einem statistisch signifikanten und konzentrationsunabhängigen Effekt.

1. In PHA-stimulierten Zellen wird ab einer Konzentration von 10^{-8} M eine konstante, statistisch signifikante Hemmung von im Mittel 75 % erreicht. Damit liegt Beclomethason etwas unter den Hemmeffekten von Clobetasol (88,5 %).
2. In Con A-stimulierten PBMC stellen sich die gleichen Effekte dar wie nach PHA-Stimulation. Ab einer Konzentration von 10^{-8} M wird eine konstante, statistisch signifikante Hemmung von im Mittel 82 % erreicht. Hier liegt das gleiche Hemmausmaß wie unter Zugabe von Clobetasol (79 %) vor.

Myxothiazol

Im Gegensatz zu den deutlich konzentrationsabhängigen Effekten von Myxothiazol auf den Sauerstoffverbrauch humaner PBMC, lässt sich für die Effekte auf die IL-6-Synthese nur ein geringer Unterschied zwischen 14 μ M und 40 μ M Myxothiazol finden.

1. Myxothiazol hat keinen Einfluss auf die IL-6-Synthese in ruhenden PBMC.
2. In PHA-stimulierten Zellen kommt es zu einer statistisch signifikanten Hemmung der Interleukin-Produktion von im Mittel 70 %.
3. In Con A-stimulierten Zellen werden ebenfalls signifikante Hemmeffekte von etwa 80 % erzielt.

Es wurden demnach die folgenden Unterschiede zwischen den drei untersuchten Glucocorticoiden gefunden:

- I. In ruhenden Zellen zeigen die drei Glucocorticoide keinen Effekt auf die IL-6-Synthese humaner PBMC. Sie unterscheiden sich dabei untereinander nicht.
- II. In PHA- und Con A-stimulierten Zellen hemmt Dexamethason die IL-6-Synthese *konzentrationsabhängig*. Im Gegensatz dazu ist der Hemmeffekt der topischen Glucocorticoide Clobetasol und Beclomethason in stimulierten Zellen *konzentrationsunabhängig*.
- III. In niedrigen Konzentrationen zeigen die topischen Glucocorticoide eine stärkere genomische Potenz. In sehr hohen Konzentrationen ist der Hemmeffekt von Dexamethason und den topischen Glucocorticoiden annähernd gleich.
- IV. Die beiden topischen Glucocorticoide Clobetasol und Beclomethason sind in ihrer Wirkung auf die IL-6-Synthese stimulierter humaner PBMC nahezu identisch.
- V. Das kinetische Verhalten der einzelnen Glucocorticoide unterscheidet sich nicht zwischen PHA- und Con A-stimulierten Zellen.

3.3 Quantitative Bestimmung von Apoptose mittels Durchflusszytometrie (FACS)

3.3.1 Standardisierungsbedingungen

Effekte von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason auf die Apoptose in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Die Induktion von Apoptose über den Fas/CD95-Rezeptor von Jurkat-T-Zelllinien mittels anti-Fas/CD95-AK und die nachfolgende Detektion der Apoptose mit Annexin V-FITC/PI-Färbung stellt ein standardisiertes System zur durchflusszytometrischen Analyse von Apoptose dar. Die Induktion von Apoptose an einer Fas/CD95-exprimierenden humanen Jurkat-T-Zelllinie diene daher als Positivkontrolle zur Etablierung unseres Zellsystems. Dazu wurden aus Jurkat-Zellkulturen (siehe 2.1.3) präparierte Zellsuspensionen mit Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason in einer Konzentration von jeweils 10^{-4} M behandelt und für jeweils 2 h, 4 h, 6 h und 16 h inkubiert. Die Zellen wurden dann wie unter 2.4.4 beschrieben zur durchflusszytometrischen Messung von Apoptose verwendet. Als Positivkontrolle wurde mittels anti-Fas/CD95-Antikörper (Klon 7C11) Apoptose induziert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 31 und 32 dargestellt.

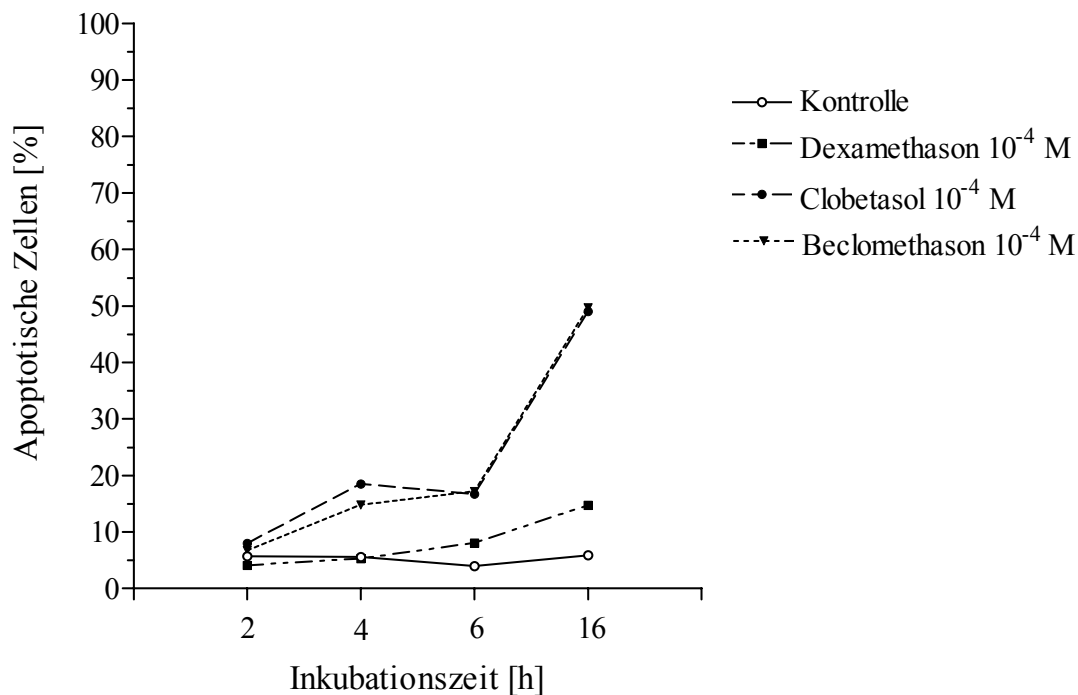


Abb. 31: Einfluss von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason auf Apoptose von Jurkat-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Repräsentatives Experiment von $n = 3$.

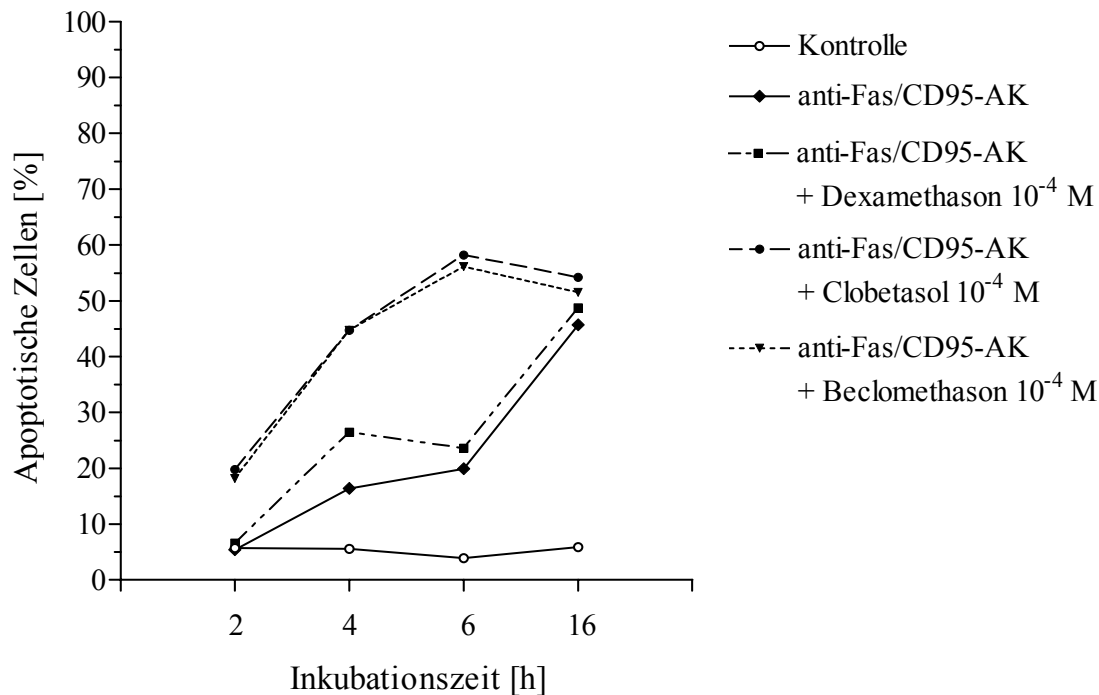


Abb. 32: Einfluss von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason auf anti-Fas/CD95-induzierte Apoptose von Jurkat-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Repräsentatives Experiment von n = 3.

Dabei konnte gefunden werden, dass es bei Jurkat-Zellen nach einer Inkubationsdauer von 16 h sowohl für Dexamethason als auch für Beclomethason und Clobetasol zu einem deutlichen Anstieg apoptotischer Zellen kam (Abb. 31). Der Anteil spontan-apoptotischer Zellen lag zwischen 3,9 % nach 6 h Inkubation und 5,9 % nach 16 h Inkubation. Nach 6 h Inkubation mit Dexamethason betrug der Anteil apoptotischer Zellen 8,1 %, nach 16 h Inkubation betrug dieser 14,7 %. Der Anteil apoptotischer Zellen nach Zugabe von Clobetasol bzw. Beclomethason betrug nach 6 h Inkubation 16,7 % bzw. 17,2 % und nach 16 Stunden Inkubation 49,0 % bzw. 49,7 %.

Wie Abbildung 32 zeigt, führte die monoklonale Stimulierung mit anti-Fas/CD95-AK nach einer Inkubationsdauer von 4 h zu einer Steigerung der Apoptose von 5,6 % auf 16,4 % und nach 16 h von 5,9 % auf 45,7 %. Die Zugabe von Dexamethason führte zu einem weiteren Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen auf 26,5 % nach 4 h und auf 48,8 % nach 16 h Inkubation. Nur nach Zugabe der topischen Glucocorticoide Clobetasol bzw. Beclomethason kam es bereits nach 2 h zu einem Anstieg der Apoptose auf 19,8 % bzw. 18,2 %. Mit Zunahme der Inkubationsdauer kam es im Vergleich zur Positivkontrolle zu einer weiteren deutlichen Zunahme des Anteils

apoptotischer Zellen und zwar nach 4 h auf 44,8 % (Clobetasol bzw. Beclomethason) und nach 16 h auf 54,3 % (Clobetasol) bzw. 51,6 % (Beclomethason).

Es sollte nun entsprechend diesen Ergebnissen untersucht werden, wie sich Apoptose in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer nach Zugabe der Glucocorticoide bei humanen PBMC verhält. Ausgehend von den für humane Jurkat-Zellen gefundenen Werten wurden dazu humane PBMC für 16 h, 20 h, 36 h und 48 h inkubiert (Abb. 33).

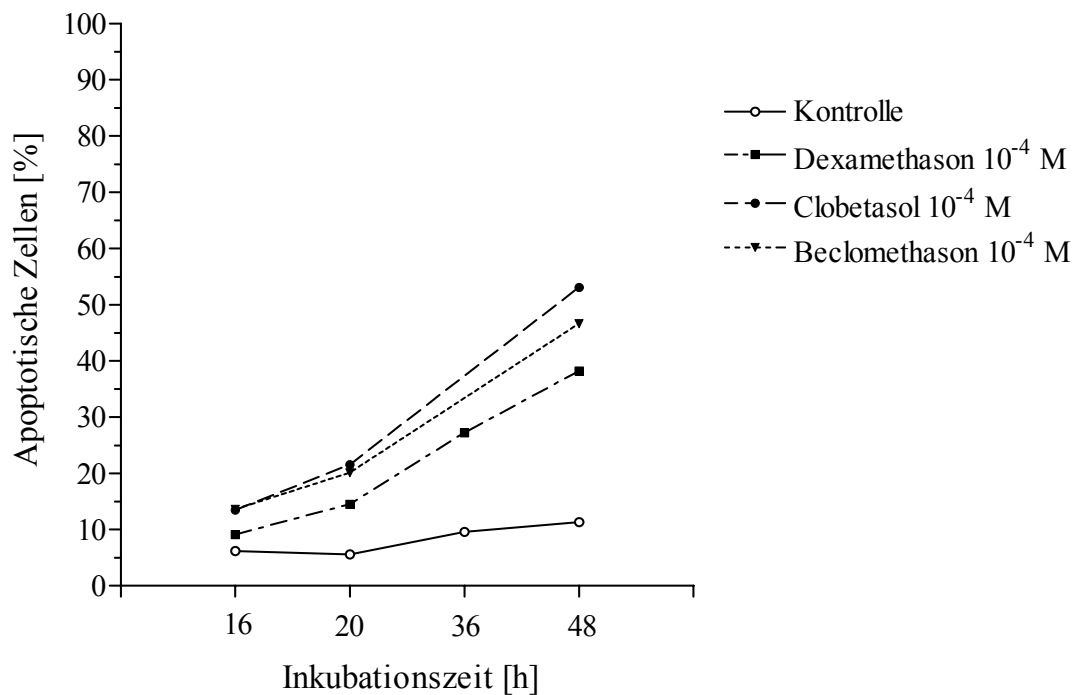


Abb. 33: Einfluss von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason auf Apoptose von PBMC in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Repräsentatives Experiment von $n = 3$.

Dabei erwies sich eine Inkubationszeit von 20 h als optimal und wurde für alle folgenden Messreihen weitergeführt. Der Anteil spontan-apoptotischer PBMC lag nach 20 h durchschnittlich bei 5,6 %. Nach einer weiteren Zunahme der Inkubationszeit stieg der Anteil spontan-apoptotischer Zellen an (9,6 % nach 36 h und 11,3 % nach 48 h). Im Unterschied zu Jurkat-Zellen kam es bei PBMC nach einer Inkubationsdauer von 16 h weder bei Dexamethason (9,1 % apoptotische Zellen) noch bei Clobetasol bzw. Beclomethason (13,5 % bzw. 13,6 % apoptotische Zellen) zu einer deutlichen Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen. Nach einer Inkubationsdauer von 20 h stieg dann der Anteil apoptotischer Zellen bei allen drei Glucocorticoiden an und zwar bei Dexamethason auf 14,5 %, bei Clobetasol auf 21,5 % und bei Beclomethason auf 20,1 %.

Humane periphere T-Zellen exprimieren in nicht aktiviertem Zustand kaum Fas/CD95-Rezeptor ([Yang et al. 1995](#)). Erwartungsgemäß zeigte sich in unseren Experimenten keine Induktion von Apoptose durch anti-Fas/CD95-AK an nicht aktivierten humanen PBMC (Daten nicht gezeigt).

Vergleich von Annexin V – Färbung und DNA – Färbung

Die DNA-Färbung sollte neben der Färbung mit Annexin V ein zweites System zur Detektion apoptotischer Zellen darstellen und gleichzeitig als Kontrolle dienen. Die Äquivalenz beider Systeme konnte durch eine enge Korrelation der Messwerte nachgewiesen werden. Abbildung 34 (A) zeigt beispielhaft die Ergebnisse an Jurkat-Zellen nach Inkubation von 16 h mit dem jeweiligen Glucocorticoid in einer Konzentration von 10^{-4} M. Abbildung 34 (B) stellt die Ergebnisse an PBMC nach Inkubation von 20 h mit dem jeweiligen Glucocorticoid in einer Konzentration von 10^{-4} M dar.

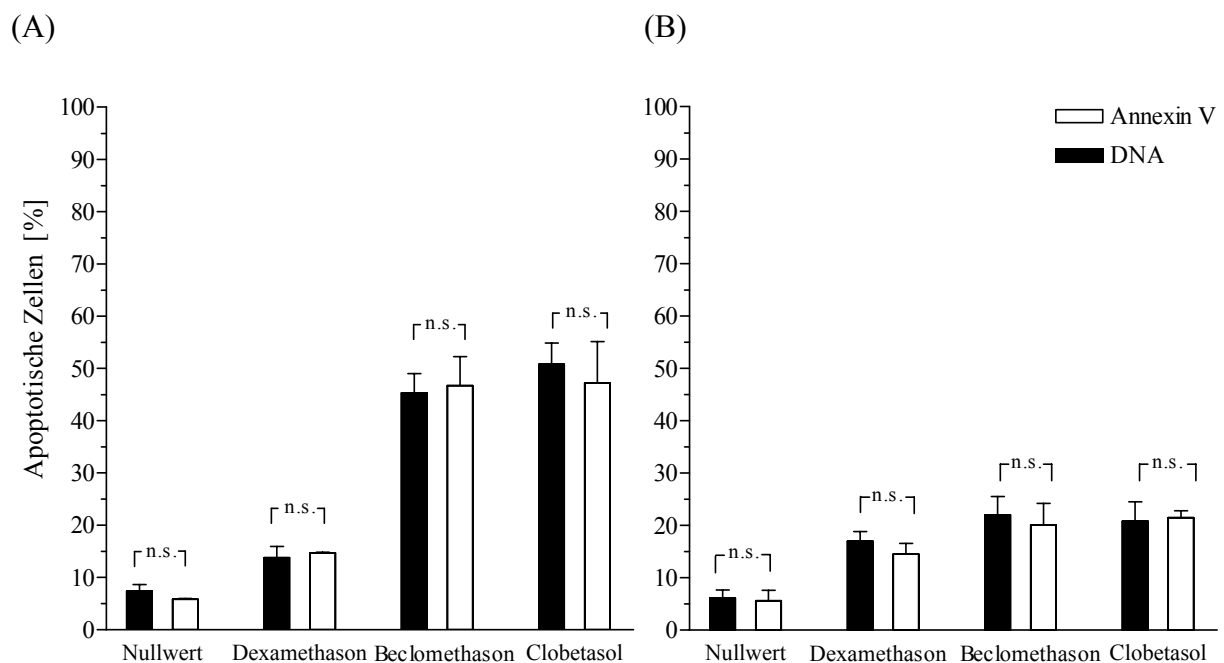


Abb. 34: Vergleichbarkeit von Annexin V-Färbung und DNA-Färbung bei (A) Jurkat-Zellen und (B) PBMC. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 3-4$. Angegeben sind der Mittelwert und der SD. n.s. = nicht signifikant.

3.3.2 Effekte von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason auf die Apoptose von Jurkat-Zellen

Nachdem für nicht aktivierte Jurkat-Zellen ein deutlicher Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen nach einer Inkubationsdauer von 16 h gefunden wurde (vgl. 3.3.1), sollte der Einfluss der Glucocorticoide auf dieses Testsystem quantifiziert werden. Dazu wurden die Zellen mit dem jeweiligen Glucocorticoid in Konzentrationen von 10^{-4} M, 10^{-5} M und 10^{-8} M für 16 h inkubiert. Anti-Fas/CD95-AK wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Der Anteil spontan-apoptotischer Zellen nach 16 h Inkubation lag bei $5,8 \% \pm 0,2 \%$ ($n = 3$). Die Zugabe von Dexamethason 10^{-4} M bzw. 10^{-5} M führte zu einem signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen auf $14,7 \% \pm 0,1 \%$ ($p = 0,03$) bzw. $10,7 \% \pm 0,4 \%$ ($p = 0,03$). Für die topischen Glucocorticoide zeigte sich, dass es erst nach Zugabe von Clobetasol 10^{-4} M bzw. Beclomethason 10^{-4} M zu einer signifikanten Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen kam und zwar auf $46,7 \% \pm 5,6 \%$ ($p = 0,02$) bzw. auf $47,3 \% \pm 7,9 \%$ ($p = 0,03$).

Die Inkubation mit anti-Fas/CD95-AK führte zu einer Induktion von Apoptose auf $47,5 \% \pm 5,4 \%$ ($p = 0,03$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 dargestellt.

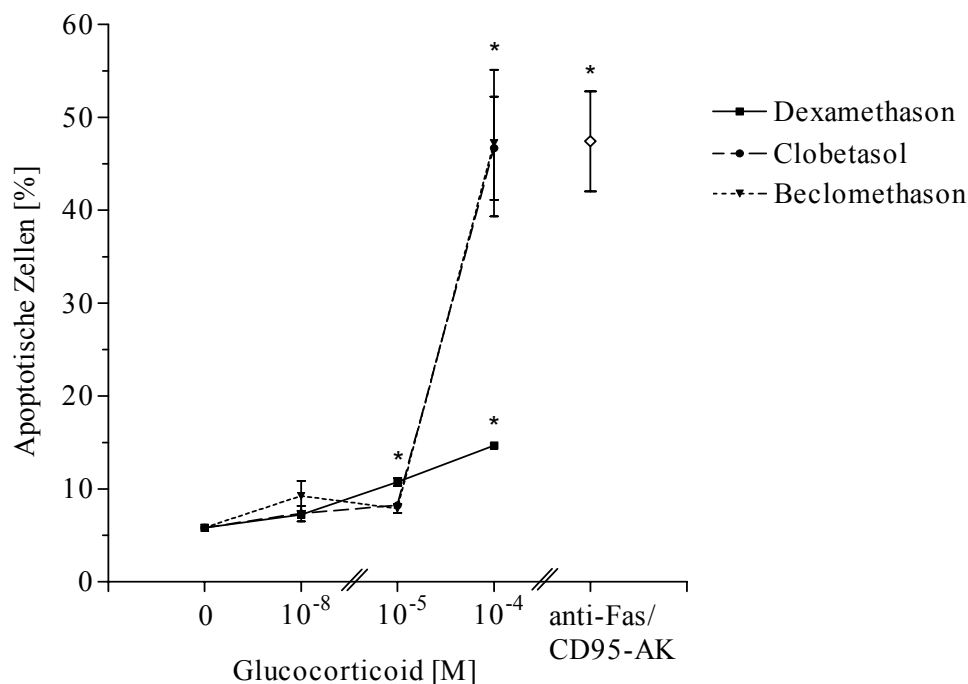


Abb. 35: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason auf Apoptose von Jurkat-T-Zellen nach 16 h Inkubation. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 3$. Angegeben sind der Mittelwert und der SD.

3.3.3 Effekte von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol auf die Apoptose von PBMC

Zur Quantifizierung der glucocorticoid-induzierten Apoptose humaner PBMC wurden die Zellen mit dem jeweiligen Glucocorticoid in Konzentrationen von 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-8} M für 20 h inkubiert. Bekannt war, dass Dexamethason in sehr hohen Konzentrationen als Induktor der Apoptose fungiert. Es interessierte dabei das Verhalten der topischen Glucocorticoide und ob sich eine direkte Abhängigkeit von der Konzentration finden lassen würde.

Es zeigte sich, dass alle drei Glucocorticoide nach 20 h Inkubation konzentrationsabhängig Apoptose induzieren. Der Anteil spontan-apoptotischer Zellen lag bei $5,6 \% \pm 2,0 \%$ ($n = 3$). Die Zugabe von Dexamethason in einer Konzentration von 10^{-4} M führte zu einer signifikanten Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen auf $14,5 \% \pm 2,0 \%$ ($p = 0,04$). Dexamethason 10^{-5} M führte zu einem nicht signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen auf $11,5 \% \pm 0,4 \%$ (10^{-6} M auf $11,1 \% \pm 0,8 \%$, 10^{-8} M auf $9,8 \% \pm 0,8 \%$).

Die Inkubation mit den topischen Glucocorticoiden führte im Vergleich dazu zu einer deutlicheren Zunahme apoptotischer Zellen. Die Inkubation mit Clobetasol führte bereits bei einer Konzentration von 10^{-5} M zu einem signifikanten Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen auf $13,2 \% \pm 0,9 \%$ ($p = 0,02$). Nach Zugabe von 10^{-4} M kam es zu einer maximalen Zunahme apoptotischer Zellen auf $21,5 \% \pm 1,3 \%$ ($p = 0,02$). Die Inkubation mit Beclomethason 10^{-4} M und 10^{-5} M für 20 h führte zu einem signifikanten Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen auf $20,1 \% \pm 4,1 \%$ ($p = 0,03$) bzw. $12,8 \% \pm 1,0 \%$ ($p = 0,04$). Beclomethason in den Konzentrationen von 10^{-6} M und 10^{-8} M führte zu einem tendenziellen, aber nicht signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen auf $11,1 \% \pm 0,8 \%$ bzw. $9,2 \% \pm 1,4 \%$. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 36 und 37 dargestellt.

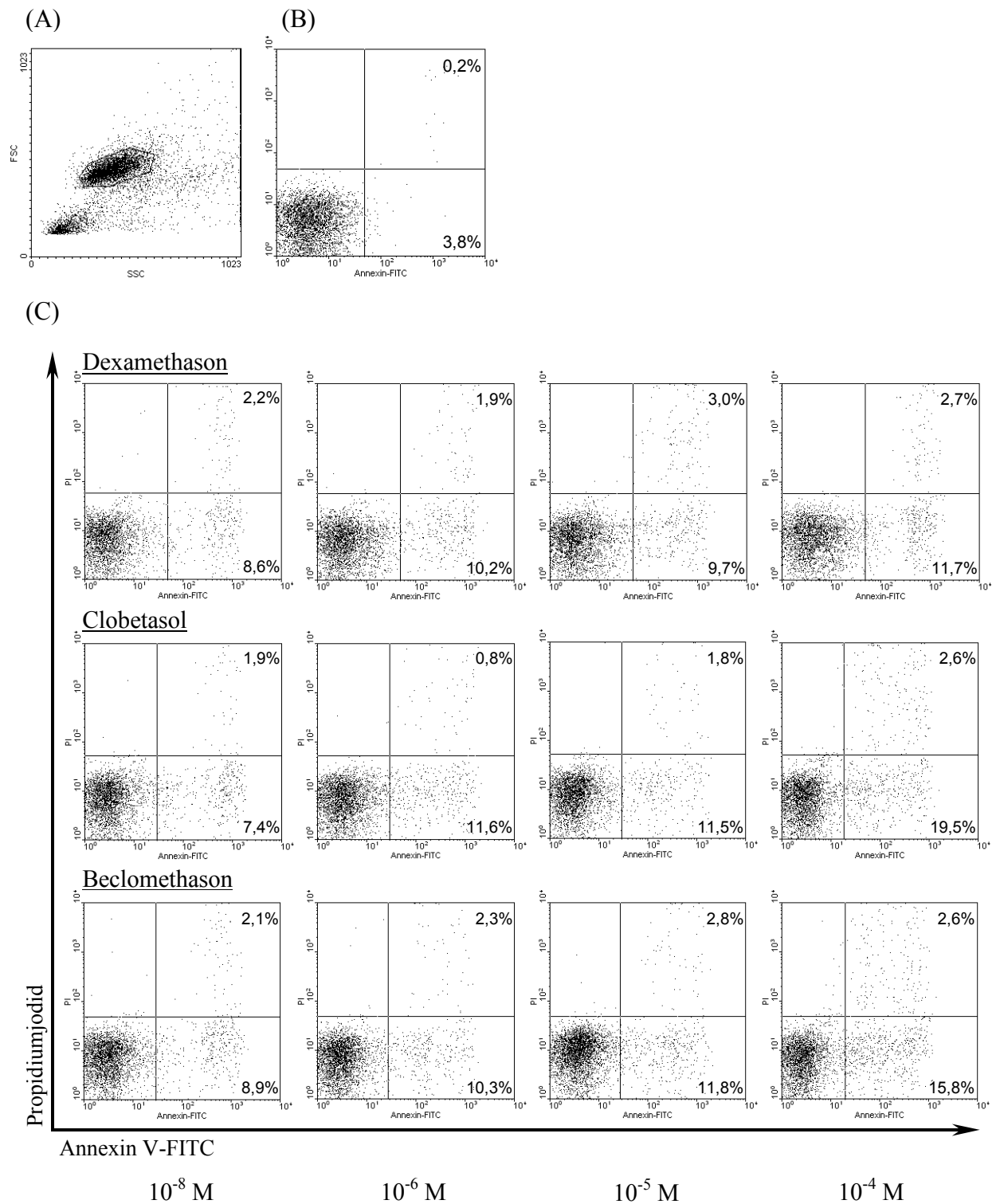


Abb. 36: Apoptose von humanen PBMC nach 20 h Inkubation. (A) und (B) in Abwesenheit von Glucocorticoiden, (C) nach 20 h Inkubation mit Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason. (A) Zweidimensionale Dot-plot-Darstellung des FSC/SSC. Das Gate wurde auf die Population vitaler Lymphozyten gesetzt. (B) und (C) Dot-plot-Darstellung der Fluoreszenz von FITC- und PI-markierten PBMC. Repräsentatives Experiment von $n = 3$.

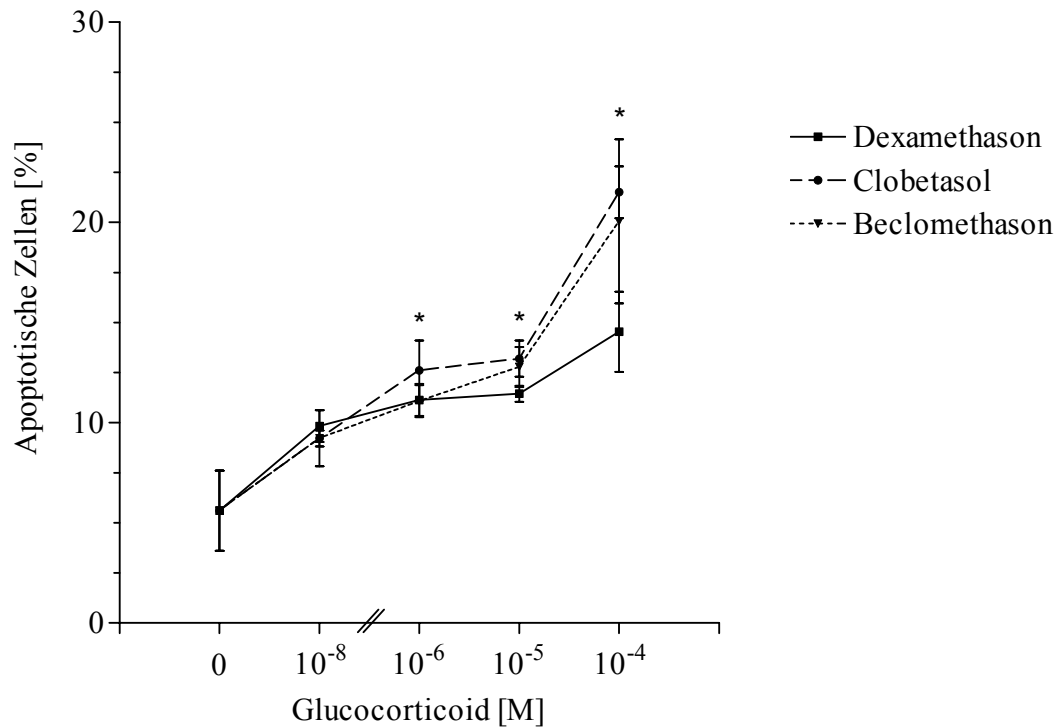


Abb. 37: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason auf die Apoptose von humanen PBMC nach 20 h Inkubation. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 3$. Angegeben sind der Mittelwert und der SD.

Ein zusammenfassender Vergleich der drei Glucocorticoide Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason führt zu folgenden Aussagen:

- I. Sowohl Dexamethason als auch die topischen Glucocorticoide führen zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Apoptose von humanen PBMC nach 20 h Inkubation.
- II. Bei niedrigen Konzentrationen unterscheiden sich Dexamethason und die topischen Glucocorticoide kaum.
- III. Bei sehr hohen Konzentrationen zeigen beide topischen Glucocorticoide einen deutlich stärkeren proapoptotischen Effekt als Dexamethason.
- IV. Die beiden topischen Glucocorticoide Clobetasol und Beclomethason unterscheiden sich hinsichtlich ihrer apoptoseinduzierenden Wirkung nahezu nicht von einander.

Myxothiazol

Die mitochondriale Funktionalität spielt eine bedeutende Rolle bei der Auslösung von Apoptose. Es wurde der Einfluss von Myxothiazol als irreversibler Hemmstoff der Atmungskette auf die Apoptose humaner PBMC untersucht. Analog zu den Experimenten unter 3.1 wurden zwei Konzentrationen (40 μM und 14 μM) eingesetzt und für 20 h inkubiert.

Dabei fand sich, dass auch Myxothiazol zu einer signifikanten Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen führte. Nach Zugabe von 14 μM Myxothiazol lag der Anteil apoptotischer Zellen bei $23,1 \% \pm 3,7 \%$ ($p = 0,01$), nach Zugabe von 40 μM bei $22,0 \% \pm 3,6 \%$ ($p = 0,02$). Es war kein signifikanter Unterschied zwischen 14 μM und 40 μM Myxothiazol nachweisbar. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 38 und 39 dargestellt.

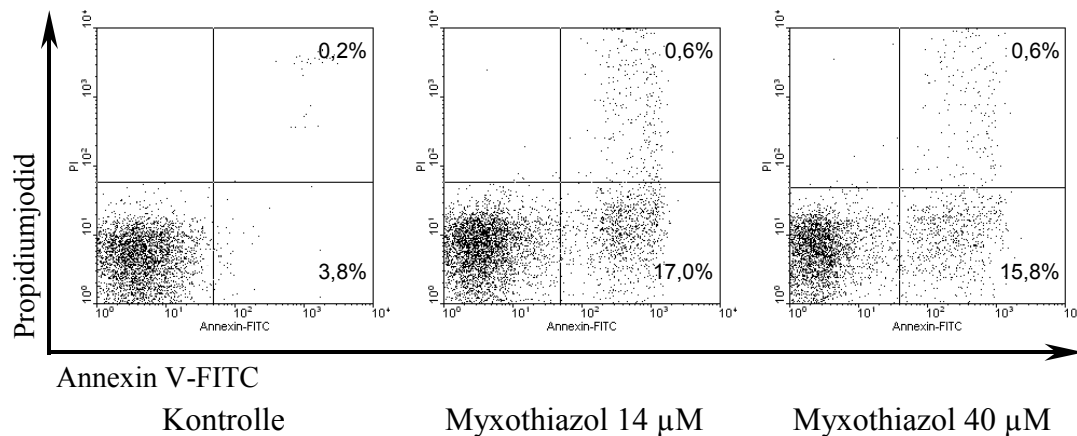


Abb. 38: Apoptose von humanen PBMC nach 20 h Inkubation mit Myxothiazol. Dargestellt sind die Ergebnisse im Annexin V-FITC/PI-Fenster. Repräsentatives Experiment von $n = 3$.

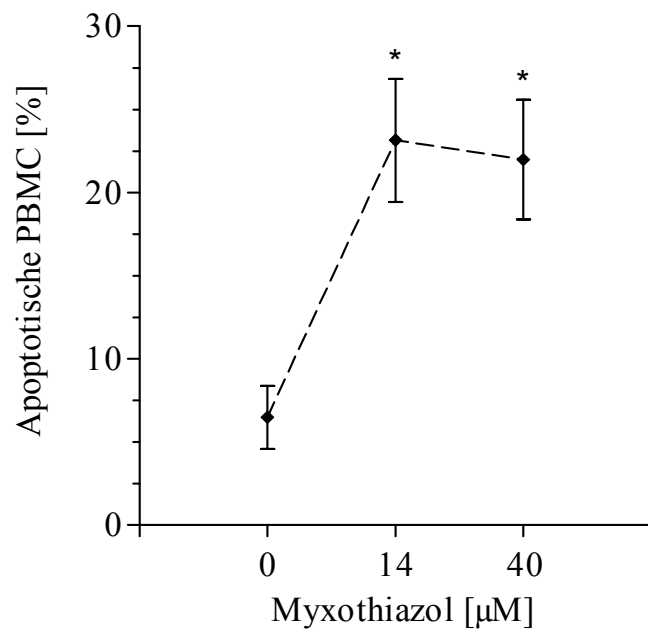


Abb. 39: Apoptose von humanen PBMC nach 20 h Inkubation mit Myxothiazol. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 3$. Dargestellt sind der Mittelwert und der SD.

4. Diskussion

4.1 Grundlagen der Glucocorticoidtherapie

Die klinische Bedeutung der Glucocorticoide steht in deutlichem Widerspruch zum aktuellen Stand der Aufklärung ihrer Wirkmechanismen. Genomisch vermittelte Effekte bilden auch heute noch die Grundlage für Vergleiche von Wirksamkeiten verschiedener Glucocorticoide und der Erstellung von Äquivalenzdosen. Die spezifisch und unspezifisch nichtgenomischen Mechanismen sind nicht hinreichend geklärt und bleiben im klinischen Alltag weitestgehend unberücksichtigt.

Die vorliegende Arbeit diene der weiterführenden Aufklärung nichtgenomischer Wirkungen verschiedener Glucocorticoide. Anhand topischer Glucocorticoide sollte ein Wirkungsprofil über die qualitativ unterschiedlichen Mechanismen auf Immunzellen erstellt und mit Dexamethason als systemische Referenzsubstanz verglichen werden. Es stellte sich die Frage, ob sich topisch eingesetzte Glucocorticoide in ihren modularen Wirkungen auf Immunzellen grundlegend vom systemisch eingesetzten Standardpräparat Dexamethason unterscheiden und ob sich Rückschlüsse auf einen optimierten Einsatz von systemischen Glucocorticoiden in der Rheumatologie und klinischen Immunologie, angepasst an Unterschiede im nichtgenomischen/genomischen Wirkungsverhältnis, ziehen lassen.

Grundlage bildete das von Buttgerit et al. entwickelte modulare Konzept der Glucocorticoidwirkungen ([Buttgerit et al. 1998](#)). Danach lassen sich drei qualitativ unterschiedliche Wirkmechanismen in Abhängigkeit von der Konzentration und der zeitlichen Latenz bis zum Wirkungseintritt unterscheiden. (1) Gut bekannt sind ihre therapeutischen Wirkungen über genomische und ligandspezifische Mechanismen, die bereits in niedrigen Konzentrationen erreicht werden. Der Wirkungseintritt erfolgt mit einer zeitlichen Latenz nach Stunden. Der Weg ist transkriptions- und translationsabhängig. (2) Der spezifisch nichtgenomische Mechanismus ist ebenfalls rezeptorabhängig, aber transkriptions- und translationsunabhängig. Schnelle Signalkaskaden werden durch niedrige bis mittlere Konzentrationen ausgelöst, die Wirkung ist nach Sekunden bis Minuten messbar. (3) Es gibt Hinweise auf unspezifisch nichtgenomisch vermittelte Effekte, die nicht durch Transkriptionsinduktion oder -repression spezifischer Gene erklärbar sind. Sehr hohe

Konzentrationen sollen dabei zu einer unspezifischen Membraninterkalierung führen. Die Effekte sind nichtgenomisch vermittelt und treten bereits nach wenigen Sekunden auf. Da bei einer Dosis von 7,5 mg bzw. 15 mg Prednisolonäquivalent rechnerisch 42 % bzw. 63 % der intrazellulären Rezeptoren besetzt sind, muss man bei intravenös verabreichten Dosen über 250 mg Prednisolonäquivalent von einer vollständigen Sättigung aller intrazellulär verfügbaren Rezeptoren ausgehen. ([Tyrell 1995](#), [Buttgereit et al. 1998](#)). Außerdem kommt es nach dem ersten Tag einer intravenösen Stoßtherapie mit Dosen von 500-1000 mg Prednisolonäquivalent zur Downregulation der intrazellulären Rezeptoren ([Oakley et al. 1999](#), [Schlaghecke et al. 1992](#)). Schließlich kann man klinisch bei hohen Dosen sofortige Wirkungen beobachten, die zu schnell eintreten, als dass sie über eine Modifikation der Genexpression vermittelt sein könnten. Dies legt den Schluss nahe, dass der therapeutische Nutzen hoher Glucocorticoiddosen über 250 mg Prednisolonäquivalent über zusätzliche, qualitativ andere nichtgenomische Mechanismen vermittelt ist.

Buttgereit et al. fanden erstmals von genomischen Potenzen deutlich abweichende nichtgenomische Wirkstärken für verschiedene Glucocorticoide an stimulierten Thymozyten ([Buttgereit et al. 1999](#)). Schmid et al. konnten diese Unterschiede an humanen PBMC bestätigen ([Schmid et al. 2000](#)). Croxtall et al. führten die vergleichenden Studien fort. Sie konnten zeigen, dass nichtgenomische Effekte auf die zytoplasmatische PLA₂-Aktivität und genomische Effekte auf die COX2-Expression von A549-Zellen durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt werden und dass sich Beclomethason-dipropionat dabei deutlich von Dexamethason unterscheidet ([Croxtall et al. 2002](#)).

Synthetische Glucocorticoide unterscheiden sich hinsichtlich ihrer chemischen Strukturen und ihrer genomischen und nichtgenomischen Wirksamkeiten (Äquivalenzdosen). Allen gemeinsam ist das chemische Grundgerüst bestehend aus drei Cyclohexanringen und einem Cyclopentanring. Unterschiede in der sterischen Konformation und Art der Substituenten bedingen die Unterschiedlichkeit ihrer Wirksamkeiten und ihres klinischen Einsatzes.

In der vorliegenden Arbeit wurde Dexamethason als Referenzsubstanz für systemische Glucocorticoide eingesetzt. Entscheidend für seine gegenüber Cortisol fast 30fach stärkere genomische Potenz sind neben der Doppelbindung zwischen C1 und C2 die Methylierung an Position 16 α und Fluorierung an Position 9 α . Durch die Substitutionen wird Dexamethason zu einem der potentesten synthetischen Cortisolanaloge.

Für seine nichtgenomischen Wirkungen sind weniger die spezifischen Seitengruppen als vielmehr deren sterische Konformation von Bedeutung. Vergleicht man Dexamethason mit dem ebenfalls systemisch applizierten Betamethason wird dieser Unterschied deutlich. Beide Substanzen weisen eine nahezu identische chemische Struktur auf (Methylierung an C16, Fluorierung an C9). Dies erklärt ihre gleichen relativen genomischen Potenzen. Der Unterschied besteht in der räumlichen Konformation der Methylgruppe an C16. Diese liegt bei Dexamethason in der alpha-, bei Betamethason in der beta-Stellung vor. Dies begünstigt Dexamethason in seiner Fähigkeit, sich in Zellmembranen zu interkalieren und darüber eine starke, nichtgenomische Potenz zu entwickeln, wohingegen Betamethason fast keine nichtgenomischen Effekte aufweist ([Schmid et al. 2000](#)).

Der klinische Einsatz von Dexamethason beruht hauptsächlich auf seinen starken genomischen Wirkungen. Sie führen bereits in niedrigen Dosen zu Entzündungshemmung und Immunsuppression. Ungeachtet der Tatsache, dass es in sehr hohen Dosen stark suppressiv auf den hypothalamisch-hypophysär-adrenalen Regelkreis wirkt, kommt es in sehr hohen Dosen bei der Behandlung von Erkrankungen und Traumen des zentralen Nervensystems, die mit einer Ödembildung einhergehen, zum Einsatz. Diese bisher empirisch und klinisch etablierte Anwendung könnte durch seine starken unspezifisch nichtgenomischen Eigenschaften, die der Ödembildung durch Interkalierung in die Membran und folgende Reduzierung ihrer Permeabilität entgegenwirkt, erklärbar werden ([Mursch et al. 2000](#)).

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass bei topischen Glucocorticoiden neben den gut etablierten genomischen Effekten auch starke nichtgenomische Wirkungen vorliegen sollten, da sie lokal so hohe Konzentrationen erreichen, dass auch nichtgenomische Mechanismen ihre gute klinische Wirksamkeit begründen müssen.

Clobetasol und Beclomethason wurden als Beispielsubstanzen für topische Glucocorticoide ausgewählt, da sie zu den am stärksten wirksamen topischen Glucocorticoiden in der Dermatologie bzw. Pneumologie zählen und ihre therapeutischen Wirkungen gut bekannt und dokumentiert sind ([Griffiths 2001](#), [Pfister et al. 1995](#), [Lipworth 1993](#)).

Wie bei Dexamethason sind auch bei den topischen Glucocorticoiden neben der Doppelbindung zwischen C1 und C2 die Substitutionen an C9 und C16 für ihre genomisch vermittelten antiinflammatorischen und antiproliferativen Effekte verantwortlich. Darüber hinaus weisen Clobetasol und Beclomethason Veresterungen an C17 α auf. Bei der Therapie entzündlicher Atemwegserkrankungen spielen genomisch vermittelte Effekte eine übergeordnete Rolle.

Ausgehend von der Annahme, dass lokal hohe Glucocorticoidkonzentrationen erreicht werden, sind auch nichtgenomische Effekte über eine unspezifische Interkalierung in die Zellmembran anzunehmen. Sie werden therapeutisch über eine Reduzierung der Membranpermeabilität, die einer entzündungsbedingt erhöhten Gefäßdurchlässigkeit entgegenwirkt, ausgenutzt ([Pfister et al. 1995](#)).

Humane PBMC nehmen eine zentrale Stellung in der zellulären und humoralen Immunantwort ein. Sie sind stimulierbar, teilungsfähig und besitzen alle wichtigen Zellbestandteile und Funktionen. Sie sind ohne großen labortechnischen Aufwand in ausreichender Menge erhältlich. Zellvitalität und repräsentative Verteilung von B- und T-Lymphozyten werden bei der Gewinnung und Isolation durch die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation nicht beeinträchtigt ([Bøyum 1968](#)). T-Lymphozyten stellen unter physiologischen Bedingungen mit einem Anteil von etwa 75 % die größte PBMC-Fraktion. B-Lymphozyten machen etwa 15 % und NK-Zellen 10 % der PBMC aus. Die für unsere Untersuchungen präparierte Zellsuspensionen bestanden somit zu einem überwiegenden und funktionell dominierenden Anteil aus T-Lymphozyten. Auf die weitere Separation einzelner PBMC-Fraktionen und die Gewinnung von Subpopulationen wurde bewusst verzichtet. Ziel war ein funktionierendes Gesamtzellsystem. In zahlreichen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass eine optimale Aktivierung der Zellen nur bei ausreichendem Zell-Zell-Kontakt und gegenseitiger funktioneller Interaktion der Zellen möglich ist ([Zemleni et al. 1999](#), [Karlsson et al. 1997](#), [Grove et al. 1994](#)).

Um ein modulares Wirkprofil der topischen Glucocorticoide zu erstellen, wurde ihr Einfluss auf die stimulierte IL-6-Produktion humaner PBMC als Beispiel für genomisch vermittelte Effekte ([Buttgereit et al. 1994](#)) untersucht. Der Sauerstoffverbrauch stellt einen Parameter des zellulären Energiestoffwechsels dar und sollte als Beispiel des unspezifisch nichtgenomischen Wirkmechanismus dienen ([Buttgereit et al. 1997](#)). Bei der glucocorticoid-induzierten Apoptose geht man davon aus, dass sie über alle drei modularen Mechanismen - genomisch, spezifisch/unspezifisch nichtgenomisch - wirkt ([Gold et al. 2001](#), [Barnes 1998](#), [Gametchu et al. 1987](#)).

4.2 Modulares Modell der Wirkmechanismen von Glucocorticoiden

4.2.1 Unspezifisch nichtgenomischer Mechanismus

Messung des Sauerstoffverbrauchs mittels Clark-Elektrode und Energiestoffwechsel von PBMC.

Der Gesamtsauerstoffverbrauch von PBMC reflektiert die ungekoppelte Atmung, den extramitochondrialen Sauerstoffverbrauch und den Sauerstoffverbrauch durch ATP-verbrauchenden Prozesse. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen stellte die Messung des Sauerstoffverbrauchs einen geeigneten Parameter des zellulären Energiestoffwechsels dar. Die Verstoffwechslung von Kohlehydraten, Fettsäuren und Aminosäuren zu Kohlendioxid und Wasser unter Verbrauch von Sauerstoff spielt die zentrale Rolle bei der Energiesynthese in Form von ATP in ruhenden wie stimulierten Zellen. Es lassen sich unter geeigneten Versuchsbedingungen durch die Messung des Sauerstoffverbrauchs Aussagen über den Energiestoffwechsel in Abhängigkeit von Testsubstanzen treffen. Glukose und anorganisches Phosphat sind wesentliche Induktoren der Glykolyse ([Seshagiri et al. 1991](#)). In ruhenden Lymphozyten ist der Beitrag der aeroben Glykolyse an der ATP-Synthese in glukosefreiem und phosphatarmen Medium vernachlässigbar gering ([Müller et al. 1986](#)). Gespeichertes Glykogen ist mit maximal 10 % an der zellulären Atmung in Lymphozyten beteiligt ([Suter et al. 1976](#)). Borsook-Eagle-Medium ist glukosefrei und enthält nur zu einem geringen Anteil anorganisches Phosphat. Die zelluläre Energiesynthese erfolgt unter diesen Bedingungen fast ausschließlich über die mitochondriale oxidative Phosphorylierung. Andere (extramitochondriale) Wege neben der mitochondrialen sauerstoffverbrauchenden Oxidation zur ATP-Gewinnung konnten vernachlässigt werden ([Rolfe et al. 1997](#)).

In den vorliegenden Untersuchungen lag der Sauerstoffverbrauch *ruhender PBMC* bei $5,84 \pm 0,22 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$ und ist vergleichbar mit Ergebnissen, die in anderen Arbeiten unter gleichen Versuchsbedingungen gefunden wurden ([Schmid et al. 2000](#), [Kuhnke et al. 2003](#)). Ruhende Lymphozyten gewinnen den Hauptteil des zellulären ATP aus der sauerstoffverbrauchenden Oxidation energieliefernder Substrate innerhalb der oxidativen Phosphorylierung im Mitochondrium. Glykolyse und anaerobe Energiegewinnung spielen eine untergeordnete Rolle. Ein Drittel des Gesamtsauerstoffverbrauchs ist spezifischen Prozessen zuzuordnen. Dabei sind die Na^+/K^+ -ATPase, die Proteinbiosynthese und das Protonenleak die hauptenergieverbrauchenden Prozesse. Ein weiterer Teil wird infolge der Phosphorylierung von Enzymen, der Verstoffwechslung metabolischer Substrate und der Anordnung und

Aufrechterhaltung des Zytoskeletts verbraucht. Schließlich wird ein Anteil für sog. *futile cycling reactions* benötigt, energieverbrauchende Reaktionszyklen, die nicht direkt in die Aufrechterhaltung des zellulären Stoffwechsels einfließen, sondern den Zellen ermöglichen soll, auf externe Signale schnell und adäquat reagieren zu können ([Buttgereit et al. 1992](#)).

Das Lektin Con A führt zur mitogenen *Stimulation* speziell von T-Lymphozyten. Es bindet an eine Untereinheit des T-Zell-Rezeptors (TCR) und führt über eine unspezifische Vernetzung der TCR zur Auslösung intrazellulärer Signalkaskaden. Es kommt zu einem Anstieg intrazellulärer second messenger wie Ca^{2+} , IP_3 und Diacylglycerol. Die Signaltransduktion führt unter Einbeziehung weiterer Regulatorproteine zu einer Aktivierung und Proliferation der Lymphozyten. Die Stimulierung erfolgt im Gegensatz zur Stimulation mit spezifischen Antigenen oder zur autoreaktiven Stimulation polykonal und erfasst somit eine große Anzahl an Lymphozyten ([Janeway et al. 1997](#)). Experimente an Rattenthymozyten zeigten, dass in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen bis zu 80 % der isolierten Thymozyten innerhalb von Sekunden durch Con A mitogen stimuliert werden konnten ([Buttgereit et al. 1993](#), [Krauss et al. 1999](#)). Experimente an humanen PBMC bestätigten die Stimulierbarkeit des Sauerstoffverbrauchs innerhalb von Sekunden ([Schmid et al. 2000](#)).

In der vorliegenden Arbeit erhöhten humane PBMC ihren Sauerstoffverbrauch durch mitogene Stimulation mit 75 μg Con A/ml (3,75 μg Con A/ 10^6 Zellen) erwartungsgemäß innerhalb von Sekunden um $3,05 \pm 0,3 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$ Zellen. Diese Steigerung um 55,4 % entspricht damit anderen gefundenen Ergebnissen unter vergleichbaren Versuchsbedingungen ([Schmid et al. 2000](#)). In stimulierten PBMC entfallen zwei Drittel des Gesamtsauerstoffverbrauchs auf spezifische Prozesse. Der Verbrauch an zellulärem ATP für Na^+/K^+ -ATPase und Proteinbiosynthese ist insgesamt um etwa 11 % des Gesamtverbrauchs gesteigert. Proteinbiosynthese, Na^+/K^+ -ATPase und Ca^{2+} -ATPase sind die Hauptenergieverbraucher in stimulierten PBMC ([Schmid et al. 2000](#)). Die mitogene Stimulation bewirkt eine Aktivitätssteigerung zellulärer Enzymsysteme und einen Anstieg der Glykolyserate. Greiner et al. konnten nachweisen, dass es nach Stimulation von Rattenthymozyten in Anwesenheit von Glukose und anorganischem Phosphat zu einer Steigerung der anaeroben Laktatsynthese und einem Abfall der aeroben Energiesynthese kam ([Greiner et al. 1994](#)). Zwei Drittel der zellulären ATP-Synthese wurden durch anaerobe Laktatproduktion gedeckt. Ist allerdings Glukose und anorganisches Phosphat nicht in ausreichender Menge vorhanden, kommt es - auch unter mitogener Stimulation - zunehmend über aerobe Wege der Energiegewinnung zur ATP-Synthese. Diese ist in ihrem Gesamtumsatz durch das fehlende Substratangebot an Glukose nicht

beeinträchtigt. Das gleiche gilt bei einem fehlenden Angebot an Glutamin ([Guppy et al. 1993](#)). Die beschriebene Abnahme der aeroben Oxidation unter Bereitstellung von Glukose wird als Crabtree-Effekt bezeichnet.

Die Ergebnisse werden von den Versuchsbedingungen (Temperatur, Sauerstoffäquilibration) und dem Inkubationsmedium (Substratanteile von Glukose, Aminosäuren und anorganischem Phosphat; Einsatz bakterizider/bakteriostatischer Substanzen) beeinflusst. Die unter 2.2 beschriebenen Versuchsbedingungen wurden in unserer Arbeitsgruppe an verschiedenen Zellsystemen etabliert und kamen so in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung ([Müller et al. 1986](#), [Buttgereit et al. 1991](#), [1992](#), [Schmid et al. 2000](#), [Kuhnke et al. 2003](#)).

In der vorliegenden Arbeit stellte sich als wesentlicher Unterschied zu Dexamethason heraus, dass topische Glucocorticoide sowohl in ruhenden als auch in stimulierten PBMC bereits bei *sehr niedrigen* Konzentrationen zu einer deutlichen Hemmung des Sauerstoffverbrauchs führten. Dexamethason hemmte den Sauerstoffverbrauch in ruhenden und stimulierten Zellen *konzentrationsabhängig* mit einer maximalen Hemmung bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10^{-4} M. Die Wirkung der topischen Glucocorticoide auf den zellulären Energiestoffwechsel blieb hingegen *konzentrationsunabhängig*. Die topischen Glucocorticoide zeigten also im Hinblick auf den zellulären Energiestoffwechsel bei sehr niedrigen Konzentrationen eine stärkere nichtgenomische Potenz als Dexamethason, während sie bei sehr hohen Konzentrationen weniger potent waren. Wie sind diese Unterschiede zu erklären?

Lipophilie und Sättigung der Interkalierung in die Membran.

Topische Glucocorticoide sind durch ihre Veresterung an Position 17 α deutlich lipophiler als systemische Glucocorticoide ([Ponec et al. 1986](#)). Beclomethason-dipropionat ist zusätzlich an C21 verestert und besitzt eine über 2,5fach höhere Lipophilie im Vergleich zu Dexamethason. Topische Glucocorticoide sind damit besser in der Lage, in biologische Membranen zu diffundieren und sich so auch in die Membranen zu interkalieren. Topische Glucocorticoide könnten demnach im Unterschied zu systemischen Glucocorticoiden bereits bei sehr niedrigen und physiologisch vorhandenen Konzentrationen deutliche direkte, unspezifische Membraneffekte auslösen.

Bei steigender Konzentration kam es zu keiner weiteren Wirkungssteigerung der topischen Glucocorticoide auf den Sauerstoffverbrauch. Diese Tatsache ist dadurch erklärbar, dass

aufgrund der hohen Lipophilie der Sättigungsbereich der Diffusions- und Interkalierungskapazität für die topischen Glucocorticoide bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen erreicht ist. Die unspezifischen Effekte wären bei 10^{-10} M maximal. Denkbar wäre auch, dass der Sättigungsbereich bei einer sehr hohen Konzentration von 10^{-4} M für topische Glucocorticoide noch nicht erreicht ist. Allerdings sollte man berücksichtigen, dass Konzentrationsbereiche höher als 10^{-4} weder physiologisch noch therapeutisch erreicht werden.

Beclomethason zeigte eine tendenziell geringere Inhibition des Sauerstoffverbrauchs im Vergleich zu Clobetasol. Dieser nicht signifikante Unterschied ist darauf zurückzuführen, dass die Steigerung der Lipophilie durch die Doppelveresterung an C17 α und C21 durch den negativ sterischen Effekt der somit verlängerten Seitengruppen eingedämmt wird. Diese Tatsache ist von Bedeutung, da Beclomethason aufgrund der Estergruppen einen deutlich stärkeren und mit Clobetasol vergleichbaren Hemmeffekt auf den Sauerstoffverbrauch hat als Dexamethason, aber nicht die nichtgenomische Wirkstärke von Clobetasol erreicht.

Dexamethason zeigte bis zu einer Konzentration von 10^{-6} M zwar eine signifikante, aber geringere Inhibition des Sauerstoffverbrauchs. Erst ab einer Konzentration $> 10^{-6}$ M wurde der Hemmeffekt von Dexamethason im Vergleich zu den topischen Glucocorticoiden größer. Das Verhältnis zwischen Hydroxyl- und Estergruppen ist entscheidend für die lipophilen Eigenschaften von Steroiden. Dabei übt die Veresterung der Seitenketten einen positiven Effekt auf die Lipophilität aus, während die Hydroxylierungen die Lipophilität herabsetzen. Während alle drei Glucocorticoide an Position 11 β eine OH-Gruppe besitzen, ist Dexamethason zusätzlich an den Positionen 17 α und 21 hydroxyliert und an keinem C-Atom verestert. Poniec et al. konnten an humanen epidermalen Keratinozyten zeigen, dass die Hydroxylierung an allen drei Positionen zu einer Herabsetzung der lipophilen Eigenschaften der Glucocorticoide führt ([Poniec et al. 1986](#)). Aufgrund der damit geringeren Lipophilie von Dexamethason im Vergleich zu den topischen Glucocorticoiden wäre eine ausreichende Sättigung der Diffusionskapazität biologischer Membranen erst ab einer Konzentration von 10^{-5} M erreicht (siehe Abb. 40). Um unspezifisch nichtgenomische Effekte über die Membran zu bewirken, wäre die Anreicherung in Membranen bei sehr hohen Konzentrationen erforderlich.

Sättigung der Bindungskapazität des Glucocorticoidrezeptors und spezifisch nichtgenomisch vermittelte Effekte.

Sind für den Effekt auf den Sauerstoffverbrauch auch schnelle, transkriptionsunabhängige Effekte via cGR α mitverantwortlich? Ausgehend davon, dass ab einem Prednisolonäquivalent von 250 mg alle Glucocorticoidrezeptoren besetzt sind, stellen zusätzliche direkte Interaktionen der Glucocorticoide mit zellulären Membranen bei hohen Konzentrationen die Hauptursache für die Hemmung des Sauerstoffverbrauchs dar. Für mittlere Konzentrationen $< 10^{-6}$ M, die ebenfalls eine signifikante Hemmung des Sauerstoffverbrauchs zeigten, muss aber ein glucocorticoidrezeptorabhängiger Mechanismus über zytosolische oder mögliche membranständige GR mitdiskutiert werden. Erste Hinweise auf nichtgenomische, cGR-vermittelte Effekte kamen aus Zellkulturexperimenten. Kurze Inkubationen mit Glucocorticoiden für Minuten führten zu einer schnellen Polymerisation und Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts von humanen Endometriumzellen ([Koukouritaki et al. 1997](#)). Dieser Prozess war nicht proteinsynthese-abhängig aber eine schnelle Aktivierung von Proteinkinasen war an diesen Effekten beteiligt. Croxtall et al. konnten zeigen, dass die schnelle Modulation der zytokin-stimulierten Arachidonsäure-Produktion durch Dexamethason MAPK- und cPLA₂-abhängig war ([Croxtall et al. 2000](#)). Dieser Effekt trat innerhalb von Minuten ein und war durch RU486, nicht aber durch Proteinsyntheseinhibitoren blockbar. In einer weiterführenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Beclomethason-vermittelte Effekte auf die Hemmung der COX2-Expression von A549 Zellen durch Geldanamycin (bindet selektiv an HSP90 des cGR und verhindert die Translokation des Steroid-Ligand-Komplexes in den Zellkern), nicht aber durch PP2, einen src-Inhibitor, blockbar waren (Croxtall et al. 2002). Die Effekte von Dexamethason auf die COX2-Expression waren in der gleichen Studie ebenfalls durch Geldanamycin und NF- κ B, nicht aber durch PP2 blockbar, während die Effekte auf die cPLA₂ Aktivität durch PP2 hemmbar war, durch Geldanamycin und NF- κ B aber unbeeinflusst blieb. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass Beclomethason cGR- und proteinsynthese-abhängige Mechanismen beeinflusst, während Dexamethason über den cGR sowohl transkriptionsabhängig als auch transkriptionsunabhängig agieren kann.

In den Experimenten zum Energiestoffwechsel ist analog zur obigen Aussage der durch sehr hohe Konzentrationen von Dexamethason (10^{-5} M bis 10^{-4} M) nach Sekunden ausgelöste Effekt am ehesten als unspezifisch nichtgenomisch zu definieren. Es erfolgt eine Interkalierung in Zellmembranen und eine daraus folgende direkte Wechselwirkungen mit physikochemischen Eigenschaften der Membransysteme. Für die bereits signifikanten Effekte bei Konzentrationen

ab 10^{-6} M und kleiner ist aber noch nicht von einer kompletten Rezeptorauslastung auszugehen. In diesen Konzentrationsbereichen ist noch kein zusätzlicher, signifikanter, unspezifisch nichtgenomischer Effekt zu erwarten. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Signaltransduktion über schnelle Signalkaskaden nach Bindung an den zytosolischen und/oder membranständigen Glucocorticoidrezeptor für die schnellen Effekte von Dexamethason in Konzentrationsbereichen von 10^{-10} M bis 10^{-6} M mitverantwortlich sind.

Für die topischen Glucocorticoide könnte diese Hypothese auf den gesamten Konzentrationsbereich von 10^{-10} M bis 10^{-4} M übertragen werden. Wenn man davon ausgeht, dass die deutlichen und signifikanten Effekte ab 10^{-10} M schnelle, über den cGR vermittelte Effekte darstellen, ist der deutlichere Hemmeffekt durch die stärkere Bindungsaffinität der topischen Glucocorticoide im Vergleich zu Dexamethason zum cGR erklärbar. Da keine weitere Wirkungssteigerung bei zunehmender Konzentration zu sehen war, könnte bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen eine vollständige Rezeptorauslastung erreicht worden sein. Zu berücksichtigen sind aber die ausgeprägteren lipophilen Eigenschaften der topischen Glucocorticoide und die dadurch bessere Fähigkeit zur Interkalierung in Membranen. Wäre bei einer Konzentration von 10^{-10} M bereits eine vollständige Rezeptorauslastung erreicht, müsste man bereits hier einen zusätzlichen, unspezifisch nichtgenomischen Effekt sehen, der stärker wäre als der gezeigte Effekt bei sehr hohen Dexamethason-Konzentrationen. Denkbar wäre aber auch, dass auch bei der höchsten eingesetzten Konzentration das Steroid-Rezeptor-Sättigungsgleichgewicht für die topischen Glucocorticoide noch nicht erreicht ist. Dagegen spricht aber die um ein Vielfaches stärkere Bindungsaffinität der topischen Glucocorticoide gegenüber Dexamethason ([Ponec et al. 1986](#), [Wolff et al. 1978](#)). Ob schnelle Signalkaskaden via zytosolischen Glucocorticoidrezeptor an den Effekten der Glucocorticoide auf den Sauerstoffverbrauch beteiligt sind, wird derzeit durch den Einsatz des spezifischen Glucocorticoidrezeptorinhibitors RU486 in weiterführenden Experimenten untersucht. Wäre der cGR an den schnellen Glucocorticoideffekten beteiligt, müssten diese Effekte durch RU486 antagonisierbar sein.

Reflektieren die beobachteten Effekte direkte Wirkungen an Membranen oder sekundäre Effekte infolge verminderter ATP-Synthese? Buttgerit et al. konnten an Con A-stimulierten Thymozyten zeigen, dass die Hemmung des Protonentransports über biologische Membranen durch Glucocorticoide nicht als Folge einer Hemmung der ATP-Synthese, sondern durch direkte Interaktionen mit den Membranen und membranassoziierten Proteinen erfolgt ([Buttgerit et al.](#)

[1997](#)). Der Sauerstoffverbrauch, der durch die Na^+/K^+ -ATPase und Ca^{2+} -ATPase entsteht, konnte in *in vitro* Experimenten durch verschiedene Glucocorticoide gehemmt werden. Der Sauerstoffverbrauch durch die Proteinbiosynthese blieb dabei unbeeinflusst. Die Hemmung des Energiestoffwechsels durch Glucocorticoide kommt primär durch die Beeinflussung der Kationenpumpen zustande. In *in vitro* Experimenten an Rattenthymozyten wurde gezeigt, dass Methylprednisolon die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reduziert. In diesen Experimenten und in Experimenten an humanen Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass die Reduktion des intrazellulären Ca^{2+} nicht durch einen Aktivitätsanstieg der ATPase verursacht wurde, sondern durch eine direkte Blockierung der Ionenpermeabilität durch Glucocorticoide bedingt war. Die ATP-Reduzierung würde demnach aus einem verminderten Energiebedarf resultieren. Dies bedeutet, dass Glucocorticoide zu einem gewissen Anteil die mitochondriale oxidative Phosphorylierung direkt hemmen und das Protonenleak über die Membran verstärken. Auch hierdurch resultiert eine Reduzierung der zellulären ATP-Synthese ([Buttgereit et al. 1994](#)).

Die Effekte der topischen Glucocorticoide und Dexamethason auf den Sauerstoffverbrauch treten sofort ein und sind bereits nach wenigen Sekunden bis Minuten maximal. Sie erfolgen somit transkriptionsunabhängig und werden über physikochemische Wechselwirkungen des Glucocorticoidmoleküls mit der Zell- und mitochondrialen Membran vermittelt. Durch die Interkalierung in die Membranen kommt es zu einer Änderung des transmembranären elektrischen Potentials und damit zu einer Modulation der Kationenpermeabilität. Diese membranstabilisierende Wirkung von Glucocorticoiden konnte in verschiedenen Arbeiten an verschiedenen Zellsystemen bewiesen werden ([Lamche et al. 1990](#), [Hall et al. 1994](#)).

Hemmen Glucocorticoide Prozesse, die in frühen Aktivierungsschritten von Lymphozyten involviert sind? Dexamethason verhinderte die Stimulation durch Con A konzentrationsabhängig und Beclomethason konzentrationsunabhängig, während Clobetasol keinen Einfluss zeigte (siehe 3.1.4). Einige der zeitigsten Ereignisse nach einer mitogenen Stimulation stellen die Beeinflussung des transmembranären Ionentransports (K^+ - und H^+ -Efflux, Na^+ - und Ca^{2+} -Influx) und die Hydrolyse von Inositol-4,5-bisphosphat (mobilisiert intrazelluläres Ca^{2+}) und Diacylglycerol (aktiviert PKC) innerhalb von Minuten dar. Buttgereit et al. konnten an Rattenthymozyten zeigen, dass auch Methylprednisolon zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der Stimulierbarkeit führte ([Buttgereit et al. 1993](#)). Er wies nach, dass Methylprednisolon dabei den Ca^{2+} -Influx nach Con A-Stimulation inhibiert. Es ist wahrscheinlich, dass dieser Vorgang auch für die Effekte von Dexamethason und Beclomethason auf die Stimulierbarkeit in den vorliegenden Experimenten mitverantwortlich ist.

Cytochrom c-Oxidase-Bindung und direkte Beeinflussung der oxidativen Phosphorylierung.

Glucocorticoide können direkt zu einer Beeinflussung der oxidativen Phosphorylierung führen ([Simon et al. 1998](#), [Bennett et al. 1996](#)). Bennett et al. fanden, dass niedrige Glucocorticoidkonzentrationen in Ratten die Aktivität der Cytochrom c-Oxidase reduzieren. Um die Effekte der Glucocorticoide im Vergleich zu Myxothiazol, einem reinem Atmungskettenhemmstoff, zu bewerten, wurden zwei Konzentrationen, bei denen der Sauerstoffverbrauch zu 25 % (IC 25) und zu 50 % (IC 50) gehemmt wurde, ausgewählt. In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass der stärkste erreichte Hemmeffekt der Glucocorticoide durch Dexamethason bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10^{-4} M nicht den Hemmeffekt der IC 25 von Myxothiazol erreicht und weit unter dem Hemmeffekt der IC 50 von Myxothiazol bleibt. Damit ist unwahrscheinlich, dass die Effekte der Glucocorticoide auf den Sauerstoffverbrauch maßgeblich durch eine direkte Bindung in der mitochondrialen Atmungskette bedingt sind.

Abbildung 40 fasst die Ergebnisse aller drei Glucocorticoide zusammen. Es wurde die verbleibende Atmung nach Zugabe des Glucocorticoids als prozentuale Abweichung vom Sauerstoffverbrauch stimulierter Zellen in % angegeben. Myxothiazol wurde in den Konzentrationen angegeben, bei denen eine 25%ige (IC₂₅) bzw. 50%ige (IC₅₀) Inhibition des Sauerstoffverbrauchs mitogen stimulierter humaner PBMC gefunden wurde.

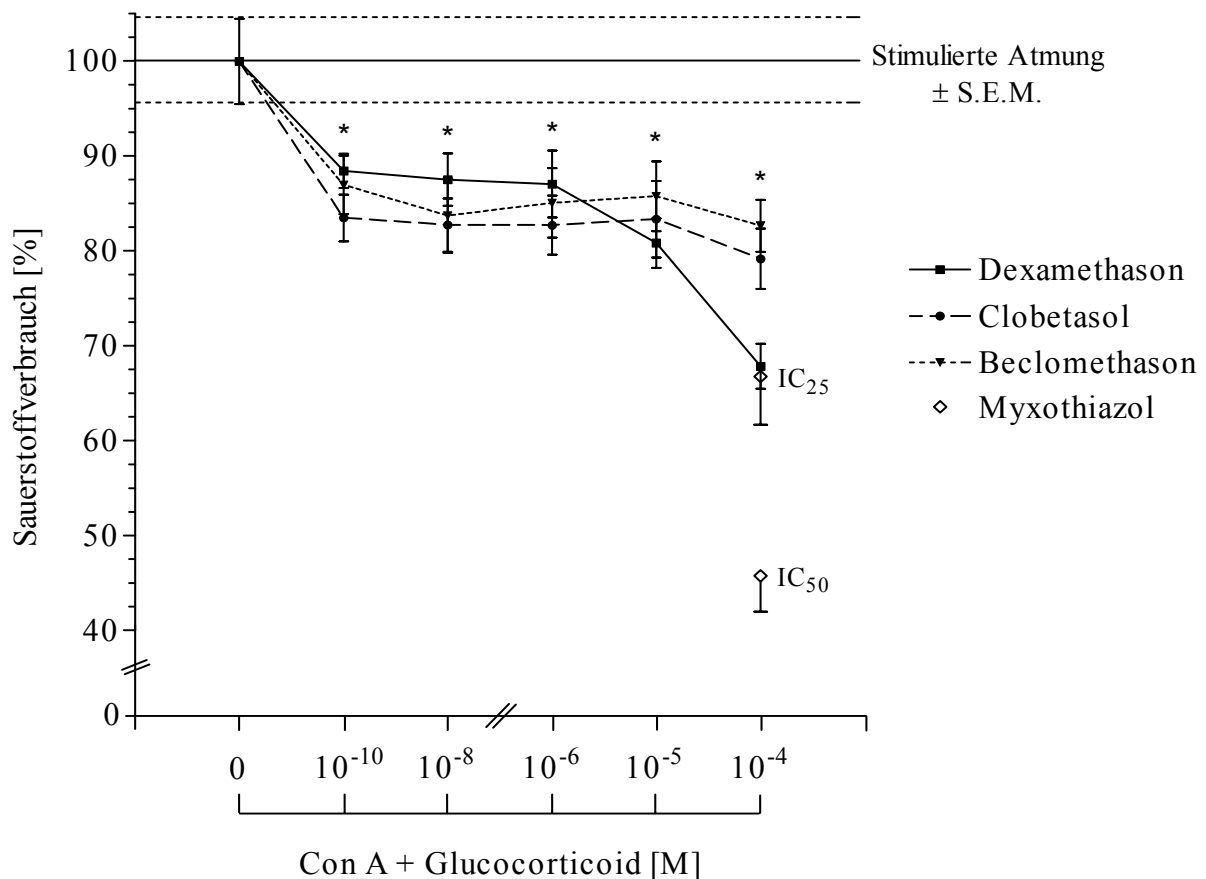


Abb. 40: Einfluss verschiedener Konzentrationen von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol auf den Sauerstoffverbrauch in Con A-stimulierten humanen PBMC. Angegeben sind der Mittelwert und der S.E.M. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

4.2.2 Genomischer Mechanismus

Messung der IL-6-Synthese mittels nichtkompetitivem ELISA und IL-6-Synthese von PBMC.

Erkrankungen, bei denen Glucocorticoide therapeutisch zum Einsatz kommen, zeichnen sich durch eine starke Expression von proinflammatorischen Regulatorproteinen aus. Da sich die therapeutische Wirkung der Glucocorticoide oft erst nach Stunden bis Tagen zeigt, geht man davon aus, dass sie über den cGR vermittelt ist und eine *de novo*-Synthese von Proteinen voraussetzt. Das konnte in zahlreichen Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* bestätigt werden ([Barnes 1998](#)).

In der vorliegenden Arbeit wurden die genomischen Glucocorticoidwirkungen auf die IL-6-Synthese ruhender und stimulierter PBMC untersucht, weil IL-6 als ein essentielles und multifunktionales Zytokin viele Aspekte der Immunantwort und der Akut-Phase-Reaktion von Entzündungen reguliert. *In vitro* und *in vivo* agiert IL-6 u.a. als Differenzierungsfaktor für B-Lymphozyten und als Aktivierungsfaktor für T-Lymphozyten. *In vitro* konnten Effekte auf die Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen gezeigt werden ([Ogawa 1993](#), [Peters et al. 1998](#)). IL-6 ist ein potenter Wachstumsfaktor für humane Myelomzellen. Masera et al. konnte die Erhöhung der Dichte von Glucocorticoidrezeptoren in zwei humanen osteoblastenähnlichen Zelllinien, Saos-2 und MG-63, durch IL-6 zeigen ([Masera et al. 2000](#)). Erhöhte Serum- oder Plasmakonzentrationen von IL-6 können bei verschiedenen Erkrankungen wie Sepsis ([Steinmetz et al. 1995](#)), autoimmunologischen Erkrankungen ([Giacomelli et al. 1996](#)), Lymphomen, AIDS, alkoholbedingten Lebererkrankungen, bei Patienten mit Infektionen ([Buck 1994](#)) oder während Abstoßungsreaktionen von Transplantaten ([Hummel et al. 1994](#)) auftreten.

Bei der IL-6-Produktion *ruhender PBMC* handelt es sich um eine sehr niedrige „Hintergrund“-Synthese. In unseren Experimenten betrug die basale IL-6-Synthese ruhender PBMC $9,26 \pm 2,53$ pg/ml. Sie war durch keines der eingesetzten Glucocorticoide weiter zu hemmen. Die basale IL-6-Synthese war durch die Mitogene PHA und Con A auf $2494,5 \pm 496,9$ pg/ml/ 10^6 Zellen bzw. $3434,1 \pm 818,3$ pg/ml/ 10^6 Zellen *stimulierbar*. Diese Ergebnisse korrelierten gut mit anderen Untersuchungen ([Buttgereit et al. 1995](#)).

In der vorliegenden Arbeit wurde als wesentlicher Unterschied zu Dexamethason festgestellt, dass die topischen Glucocorticoide bereits bei *sehr niedrigen* Konzentrationen von 10^{-10} M die IL-6-Produktion mitogen stimulierter PBMC deutlich und signifikant hemmen. Im Gegensatz zu Dexamethason ist die Hemmung der IL-6-Produktion durch topische Glucocorticoide *konzentrationsunabhängig*. Sie zeigten also im Hinblick auf die Zytokinproduktion mitogen stimulierter Zellen bei sehr niedrigen Konzentrationen eine deutlich stärkere genomische Potenz. Bei sehr hohen Konzentrationen waren die topischen Glucocorticoide und Dexamethason in ihrer genomischen Potenz annähernd gleich. Die beiden topischen Glucocorticoide unterschieden sich dabei in ihrer genomischen Potenz kaum.

Bindungsaffinität zum humanen Glucocorticoidrezeptor α und Lipophilität.

Die beiden topischen Glucocorticoide Clobetasol und Beclomethason besitzen eine um ein Vielfaches höhere Rezeptorbindungsaffinität zum cGR α im Vergleich zu Dexamethason. Entscheidend hierfür ist die Veresterung an Position 17 α von Clobetasol und Beclomethason. Während es durch die Einführung einer Ester-Gruppe an Position 21 bereits zu einem Anstieg der Bindungsaffinität kommt, führt erst die Veresterung an Position 17 α zu der beobachteten signifikanten Erhöhung der Bindungsaffinität ([Pörtner et al. 1988](#)). Wie Hammer et al. mit Hilfe eines molekularen GR-Ligandbindungsdomänen-Modells an einer GR-transfizierten COS-7-Zelllinie zeigen konnten, besitzt die Ligandbindungsdomäne des GR α eine sterische Kavität im Bereich von Position 17 des Steroidmoleküls. 17 α -Ester können unter der Bildung von van der Waals-Bindungskräften diese Kavität in einer für sie energetisch günstigen Konformation einnehmen und mit den Aminosäuren des Rezeptors interagieren. Das erklärt die hohe Bindungsaffinität ([Hammer et al. 2003](#)).

Beclomethason zeigte wie Clobetasol bereits bei sehr geringen Konzentrationen von 10^{-10} M und 10^{-8} M eine signifikante Hemmung der IL-6-Synthese humaner PBMC, erreicht aber nicht den Hemmeffekt von Clobetasol. Beclomethason ist neben der Veresterung an Position 17 α zusätzlich an Position 21 verestert. Wie Hammer et al. zeigten, interagiert die gesteigerte Lipophilie von 17,21-Doppellestern mit dem sich daraus ergebenden negativen sterischen Effekt. In der sterischen Nähe von Position 21 ist die Größe der Ligandbindungsdomäne wesentlich restriktiver gestaltet und besitzt nicht eine von Position 17 vergleichbare Kavität. Um sich an den GR α binden zu können, sind 21-Ester gezwungen, eine energetisch ungünstigere Konformation einzunehmen, die ihre geringere Bindungsaffinität erklärt. 17,21-Doppellester verbinden die Bindungseigenschaften von 17- und von 21-Estern. Die Bindungsaffinität wird dabei maßgeblich von der Länge der Substituenten bestimmt. Aus der zunehmenden Länge der Estergruppe resultiert eine Abnahme der Rezeptorbindungsaffinität. Lipophilie und Rezeptorbindungsaffinität können somit nicht uneingeschränkt in Beziehung gesetzt werden. Würthwein et al. zeigten, dass die relative Bindungsaffinität des 17,21-Esters durch die Veresterung an Position 21 niedriger als die von Dexamethason war (Würthwein et al. 1990). Diese Aussage widerspricht jedoch den in der vorliegenden Arbeit und von Hammer et al. gefundenen Wirkstärken für Beclomethason und Dexamethason.

In mitogen-stimulierten PBMC hemmte Dexamethason die IL-6-Synthese deutlich in Abhängigkeit von der Konzentration, wobei eine signifikante Hemmung erst ab einer Konzentration von 10^{-8} M und höher erreicht wurde. Unter Beachtung der fehlenden Estergruppe an Position 17α konnten Ponec et al. zeigen, dass die Einführung von Hydroxylgruppen an den Positionen 11, 17α und/oder 21 zu einer veränderten Bindungsaffinität führt ([Ponec et al. 1986](#)). Während der OH-Substituent an den Positionen 11 (Clobetasol, Beclomethason und Dexamethason) und 21 (nur Dexamethason) eine erhöhte Bindungsaffinität zur Folge hat, führt die Substituierung an Position 17α (nur Dexamethason) zu einer Erniedrigung der Bindungsaffinität. Bei Steroiden, die bereits OH-Substituenten an Position 11 und 21 besaßen, konnte durch die Hydroxylierung an Position 17α eine leichte Zunahme der resultierenden Bindungsaffinität beobachtet werden (nur Dexamethason). Die Einführung eines OH-Substituenten an den Positionen 11, 17 oder 21 führte aber immer zu einer Herabsetzung der Lipophilie des Glucocorticoids.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Wirkstärken stimmen weitestgehend mit den Ergebnissen ähnlicher Arbeiten überein. Seeto et al. untersuchten die relative Potenz von Beclomethason-Estern auf die IL-5-Produktion humaner PBMC ([Seeto et al. 2000](#)). Dabei fanden sie analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, dass Beclomethason in einem niedrigen Konzentrationsbereich von 10^{-9} bis 10^{-14} M die IL-5-Synthese signifikant und konzentrationsunabhängig um etwa 80 % hemmt. Dexamethason zeigte in diesen Experimenten in der sehr niedrigen Konzentration von 10^{-10} M keinen Effekt auf die IL-5-Synthese humaner PBMC. Erst ab einer Konzentration von 10^{-8} M und höher kam es zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Interleukin-Synthese, analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten Chen et al., dass in Maus-Wildtyp-GR Dexamethasonkonzentrationen von 10^{-7} M nötig waren, um alle Wildtyp-GR-Moleküle vollständig zu besetzen ([Chen et al. 1994](#)).

Rezeptorvermittelte und transkriptionsabhängige Signaltransduktion.

Die Zeit, bis alle drei Glucocorticoide ihre volle Wirkung entfalteten, betrug mehrere Stunden. Während dieser Zeit diffundiert das Glucocorticoid durch die Zellmembran und bindet an den zytosolischen Glucocorticoidrezeptor. Das führt zu einer Konformationsänderung des Steroid-Rezeptorkomplexes und Abspaltung verschiedener Proteine sowie zu einer Affinitätserhöhung für DNA in den DNA-Bindungsdomänen des Steroid-Rezeptorkomplexes. Schließlich kann der aktivierte Steroid-Rezeptorkomplex in den Zellkern translozieren und die Transkription von

Genen in mRNA beeinflussen. Das endet in der Translation von Proteinmolekülen, die ihre biologische Wirkung entfalten können ([Beato et al. 1996](#)). Die Beeinflussung der Zytokinproduktion durch Glucocorticoide ist demnach ein *rezeptorvermittelter* und *transkriptionsabhängiger* Weg. Der zeitbestimmende Schritt sind hier die Transkription und Translation, also die *de novo*-Synthese von Proteinen. Schnelle Signaltransduktionswege, wie sie bei der Glucocorticoidwirkung auf den Energiestoffwechsel zu diskutieren sind, spielen bei den Effekten auf die Interleukinsynthese wahrscheinlich keine oder eine nur untergeordnete Rolle.

Man geht davon aus, dass Glucocorticoidrezeptoren die Transkription von Genen auf zwei verschiedenen Ebenen kontrollieren. Sie wirken teilweise über direkte Bindung des aktivierten GR-Homodimers in der GRE spezifischer Gene, die eine GR α -Bindungsstelle in ihrer Promoterregion haben. Außerdem kommt es zu einer Induktion antiinflammatorischer Gene, z.B. von Lipocortin-1 (Sudlow et al. 1996), IL1-Rezeptorantagonist (Levine SJ et al. 1996) oder I κ B α ([Adcock et al 2001](#)).

Es wird aber auch eine Beeinflussung von Genen beschrieben, bei denen keine GR α -Bindungsstelle in ihrer Promoterregion nachgewiesen werden konnte. Wahrscheinlich modulieren Glucocorticoide die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren hauptsächlich unabhängig von einer direkten DNA-Bindung und wirken dabei v.a. repressiv auf spezifische Gene, z.B. proinflammatorischer Zytokine ([Barnes 1998](#)). Direkte Protein-Protein-Interaktionen werden für das p65 von NF- κ B ([Ito et al. 2000](#)), AP-1 und STAT's wie STAT3, STAT5, STAT6 ([Karin 1998](#)) diskutiert. Glucocorticoide modulieren dabei die Bindung und/oder Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren und modifizieren so die Bildung inflammatorischer Zytokine. Diese Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren treten *in vitro* relativ spät nach der Bildung des Prä-Initiationskomplexes ein ([Herrlich 2001](#), [Nissen et al 2000](#)). Dazu werden hohe Glucocorticoidkonzentrationen benötigt ([Boumpas 1996](#)). Daher kann vermutet werden, dass auch nichtgenomische Mechanismen an der direkten Glucocorticoid- Transkriptionsfaktor-Interaktion beteiligt sind. Nicht zuletzt bewirken Glucocorticoide eine posttranskriptionelle Beeinflussung über eine Modifizierung der mRNA-Stabilität, Translation und Sekretion ([Almawi et al. 2001](#)).

Abbildung 41 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die unterschiedlichen Wirkstärken der Glucocorticoide. Die verbleibende IL-6-Synthese der PBMC wurde als prozentuale Abweichung von der IL-6-Synthese PHA-stimulierter Zellen ohne Glucocorticoidzugabe in % angegeben. Myxothiazol wurde analog zu den Untersuchungen des Sauerstoffverbrauchs in den Konzentrationen IC₂₅ und IC₅₀ mitgeführt (siehe 3.1.2 und 3.1.3). Im Unterschied zu den

Untersuchungen zum Sauerstoffverbrauch wurde in diesen Konzentrationsbereichen keine Konzentrationsabhängigkeit von Myxothiazol gefunden. Diese Tatsache könnte dafür sprechen, dass es bei eingeschränkter Energiebereitstellung (Hemmung der ATP-Bereitstellung durch Hemmung der oxidativen Phosphorylierung mittels Myxothiazol und der Glykolyse durch glukosefreies Medium) zu einer hierarchisch organisierten Abschaltung bestimmter zellulärer Funktionen unabhängig von der Konzentration kommt.

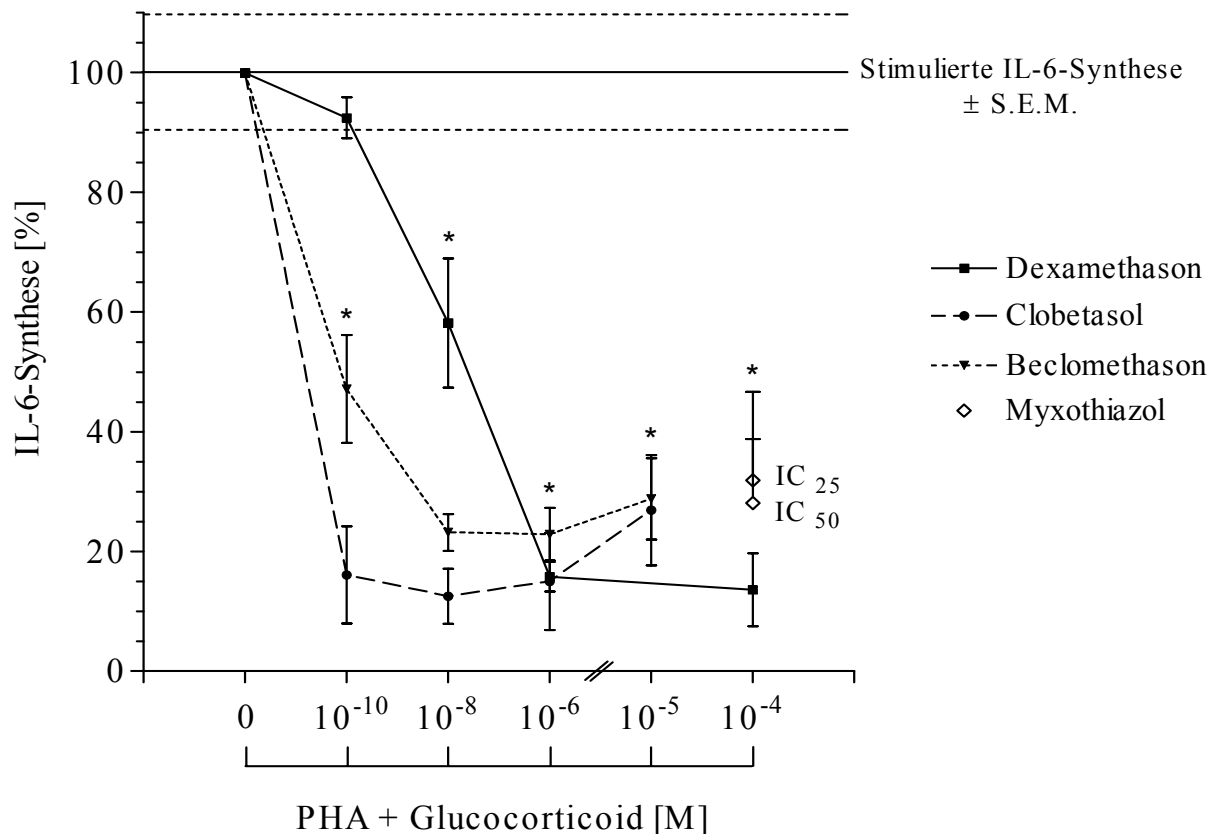


Abb. 41: Einfluss verschiedener Konzentrationen von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol auf die IL-6-Synthese PHA-stimulierter humaner PBMC. Angegeben sind der Mittelwert und der S.E.M. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

4.2.3 Apoptose als komplexer, trimodular vermittelter Prozess

Transkriptionsabhängiger Mechanismus via cGR α (Modul I)

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Dexamethason als auch die eingesetzten topischen Glucocorticoide *in Abhängigkeit von der Konzentration* Apoptose induzieren. Im Bereich niedriger Konzentrationen kam es zu einem Anstieg apoptotischer Zellen, der im Bereich mittlerer Konzentrationen signifikant wurde. Bei diesen Konzentrationen unterschieden sich die Wirkungen der topischen Glucocorticoide Dexamethason kaum. Bei sehr hohen Konzentrationen kam es zu einem deutlichen Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen. Die topischen Glucocorticoide zeigten bei einer Konzentration von 10^{-5} M einen tendenziell deutlicheren Effekt auf die Apoptoseinduktion im Vergleich zu Dexamethason. In einer Konzentration von 10^{-4} M stieg der Anteil apoptotischer Zellen durch die Zugabe der topischen Glucocorticoide signifikant stärker im Vergleich zu Dexamethason. Die beiden topischen Glucocorticoide Clobetasol und Beclomethason unterschieden sich in ihrer Wirkstärke kaum.

Die glucocorticoid-induzierte Apoptose wird zu einem wesentlichen Teil über rezeptor- und kernabhängige Mechanismen ausgelöst ([Reichardt et al. 2000](#), [Barnes 1998](#)). Das gegenwärtige Modell der genomisch vermittelten Apoptose geht von einem mehrsträngigen Prozess aus ([Distelhorst 2002](#)). Diskutiert wird zum einen die Repression von Genen, die für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase benötigt werden. Sie soll über eine Hemmung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (fos/jun) oder NF κ B erfolgen. Andererseits könnte die Transkription von Genen initiiert werden, die direkt für die Induktion von Apoptose fungieren. Distelhorst et al. fanden, dass für die glucocorticoid-induzierte Apoptose über eine Calcium-abhängige Signalkaskade zwei Gene involviert sein könnten, die für einen ATP-abhängigen Kationenkanal (P_{2X1} Rezeptor) und einen IP₃-Rezeptor kodieren ([Distelhorst et al. 1998](#)). Kroemer et al. konnten zeigen, dass Apoptose durch Blockade der mRNA- und Proteinsynthese hemmbar ist, was die Annahme eines genomisch vermittelten Mechanismus unterstützt ([Kroemer et al. 1997](#)).

Berücksichtigt man, dass die glucocorticoid-induzierte Apoptose ein hauptsächlich genomisch vermittelter Prozess ist, sind für den signifikant deutlicheren Apoptose-induzierenden Effekt der topischen Glucocorticoide im Vergleich zu Dexamethason grundsätzlich dieselben strukturellen Ähnlichkeiten verantwortlich zu machen, wie sie bereits bei den Effekten auf die IL-6-Synthese

diskutiert wurden. Wenn die Bildung des Steroid-Rezeptor-Komplexes den Initiationsschritt für die genomisch vermittelte Apoptose darstellt, bildet die Veresterung des C-Atoms der topischen Glucocorticoide an Position 17 α die entscheidende Voraussetzung für eine effektive Bindungsfähigkeit an die Ligandbindungsdomäne des cGR α unter energetisch günstigen Bedingungen.

Die Eigenschaft verschiedener Glucocorticoide, die Transaktivierung, NF- κ B-Transrepression und Apoptose unterschiedlich zu beeinflussen, wurde durch Hofmann et al. für sieben Glucocorticoide beschrieben ([Hofmann et al. 1998](#)). Es wurden auch Dexamethason und Clobetasol untersucht, allerdings nur in Konzentrationen von 10⁻⁶ M und 10⁻⁷ M. Die Effekte höherer Konzentrationen blieben unberücksichtigt. Dabei wurden sehr unterschiedliche Wirksamkeiten der einzelnen Glucocorticoide gefunden. Prednisolon und Hydrocortison waren deutlich weniger effektiv, Apoptose in CEM-C7 Zellen zu induzieren als Dexamethason und Clobetasol. Die Autoren begründeten diese Tatsache mit der strukturellen Ähnlichkeit der Glucocorticoide an Position 16 und 17, ohne auf die genauen strukturellen Unterschiede der Substituenten einzugehen. Zhang et al. fanden für Beclomethason und Dexamethason mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbare Potenzen in humanen Eosinophilen ([Zhang et al. 2000](#)).

Transkriptionsunabhängige Mechanismen

In der vorliegenden Arbeit konnte eine deutliche glucocorticoid-induzierte Apoptose nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden nachgewiesen werden. Es ist somit davon auszugehen, dass Apoptose im Wesentlichen ein transkriptions- und translationsabhängiger Prozess ist. Verschiedene Arbeiten konnten die Hemmung von glucocorticoid-induzierter Apoptose nach Zugabe von Inhibitoren der Transkription und Proteinsynthese zeigen ([Helmberg et al. 1995](#), [Hulkko et al. 2000](#)). Apoptose stellt zumindest sekundär einen streng genomisch abhängigen Prozess dar. Aufgrund der Kinetik der lymphozytären Apoptose und der Effektivität hoher Glucocorticoiddosen insbesondere bei akuten Exazerbationen autoimmunologischer Erkrankungen wird jedoch geschlussfolgert, dass auch nichtgenomische Mechanismen für die Induktion von Apoptose mitverantwortlich sein können ([Schmidt et al. 2000](#), [Reichardt et al. 1998](#)). Zusätzlich gibt es Hinweise für schnelle, cGR vermittelte, aber transkriptionsunabhängige Mechanismen, die zu Apoptose führen können ([Marchetti et al. 2003](#), [Cifone et al. 1999](#)).

Apoptose in Abhängigkeit vom zellulären ATP-Angebot und unspezifisch membranvermittelte Effekte (Modul III)

Können *direkte Membranwirkungen* der Glucocorticoide für die Induktion von Apoptose mitverantwortlich sein? Bereits Buttgerit et al. vermuteten, dass ein direkter, unspezifischer Glucocorticoideffekt an der inneren Mitochondrienmembran zumindest bei hohen Konzentrationen für den Verlust des Membranpotentials mit Anstieg der Protonenpermeabilität und der daraus resultierenden Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung verantwortlich sein könnte ([Buttgerit et al. 1997](#)). Die dadurch bedingte Verringerung des zellulären ATP-Angebots wird im Frühstadium der Apoptose, noch vor der DNA-Fragmentation beobachtet. Buttgerit et al. konnten ebenfalls nachweisen, dass unspezifisch nichtgenomische Mechanismen eine bedeutende Rolle bei der Modulation des Ca^{2+} -Transports über Zellmembranen und Veränderung des intrazellulären Ca^{2+} spielten ([Buttgerit et al. 1999](#)). Diem et al. wiesen darauf aufbauend an retinalen Ganglionzellen von Ratten nach, dass der Ca^{2+} -Influx funktionell relevant für die glucocorticoid-induzierte Hemmung der MAPK-Phosphorylierung im Prozess der Apoptosesignaltransduktion ist ([Diem et al. 2003](#)). Auch andere Arbeitsgruppen vermuteten, dass diese Vorgänge durch die Interaktion der Glucocorticoide mit zellulären Membranen und Beeinflussung derer physikochemischen Eigenschaften hervorgerufen werden ([Gold et al. 2001](#), [Leussink et al. 2001](#)).

Mitochondrien als ein zentraler Wirkort von Glucocorticoiden.

Unter physiologischen Bedingungen akkumulieren lipophile Kationen in der Mitochondrienmatrix entlang dem elektrochemischen Gradienten entsprechend der Nernst'schen Gleichung. Während der Apoptose kommt es zu einer verminderten Retention dieser Kationen in der Mitochondrienmatrix und in der Folge zu einer Störung des mitochondrialen Membranpotentials. Aufgrund der gestörten Integrität der äußeren Mitochondrienmembran können mitochondriale Intermembranproteine, wie z.B. Cytochrom c, AIF oder Procaspasen 2, 3 und 9 austreten ([Dallaporta et al. 1999](#), [Marchetti P et al. 1996](#)). Es ist davon auszugehen, dass die direkte Interaktion von Glucocorticoiden mit biologischen Membranen und die Beeinflussung des Kationentransports über die Membranen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Apoptose spielen.

Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und Apoptose – zwei energieverbrauchende Prozesse.

Die Wahl zwischen Apoptose und Nekrose erfolgt u.a. in Abhängigkeit vom zellulären ATP-Angebot. Ist ausreichend Energie in Form von ATP vorhanden, können Zellen die geordnete energieabhängige Signalkaskade der Apoptose nutzen. Steht der Zelle hingegen ATP nicht in ausreichendem Maß zur Verfügung, erfolgt Nekrose, ein passiver Vorgang der Zelldegradation ([Leist 1997](#)). Mindestens zwei Prozesse der frühen Apoptose sind aktive, energieverbrauchende Prozesse und damit ATP-abhängig. Dazu gehören die Expression von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche. Zum anderen ist die Kernkondensation und die Aufspaltung der DNA in Fragmente definierter Länge energieverbrauchend. Dieser Vorgang wird durch die ATP-abhängige Translokation von Caspasen in den Zellkern initiiert. Glucocorticoide senken das mitochondriale Membranpotential und vermindern folglich das zelluläre ATP-Angebot.

Die Arbeit zeigte, dass Myxothiazol als ein spezifischer Hemmstoff der mitochondrialen Atmungskette primär über die Reduktion zellulären ATPs zu einer Apoptoseinduktion führt. Myxothiazol induzierte in den Konzentrationen IC₂₅ und IC₅₀ (analog zu den Experimenten des zellulären Sauerstoffverbrauchs) Apoptose. Interessanterweise führte eine verstärkte Hemmung der Atmungskette (50%ige Hemmung des Sauerstoffverbrauchs) nicht zu einer erhöhten Apoptoserate. Dieser Umstand erklärt sich dadurch, dass sowohl die Initiation als auch verschiedene Effektorprozesse im Verlauf der Apoptose energieverbrauchende Prozesse darstellen. So scheint initial die Störung der Zell- und Mitochondrienhomöostase durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette ein wesentlicher Auslösemechanismus für Apoptose zu sein. Die eingeschränkte Bereitstellung von Energie in Form von ATP limitiert aber diesen energieverbrauchenden Prozess. Das heißt, der Notwendigkeit der Zelle, einen programmierten Zelltod auszulösen, steht die eingeschränkte Möglichkeit durch ein reduziertes Energieangebot gegenüber.

Die Apoptoseinduktion durch hohe Glucocorticoidkonzentrationen scheint ein wichtiger Mechanismus immunkompetenter Zellen zu sein und zur Effizienz der immunsuppressiven Effekte hochdosierter Glucocorticoidtherapien beizutragen ([Schmidt et al. 2000](#)). In *in vivo* Experimenten untersuchten Migita et al. die Effekte hochdosierter Methylprednisolon-Infusionen auf die Induktion von Apoptose in T-Lymphozyten bei Patienten mit schweren autoimmunologischen Erkrankungen ([Migita et al. 1997](#)). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion in CD4⁺-Zellen stärker war als in CD8⁺-Zellen.

Apoptose via spezifischer mGR (Modul II)

Spezifische, membranständige Rezeptoren für Glucocorticoide auf humanen Zellen wurden erstmals von Gametchu et al. auf einer humanen leukämischen Zelllinie und von Bartholome et al. auf humanen PBMC unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen ([Gametchu et al. 1993](#), [Bartholome et al. 2004](#)). Gametchu et al. äußerten frühzeitig den Verdacht, dass membranständige Glucocorticoidrezeptoren für die Induktion von Apoptose mitverantwortlich sein könnten. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Expression von mGR auf humanen CCRF-CEM-Zellen vom Zellzyklus reguliert ist und eine stärkste Expression in der späten Phase der DNA-Replikation (S) und während der zweiten Wachstumsphase bis hin zum Übergang in die Mitose (G₂/M) stattfindet. Des weiteren wies sie nach, dass die Expression von mGR mit der Induktion von Apoptose korreliert ([Sackey et al. 1997](#)). Die genauen Mechanismen, die zu einer mGR-induzierten Apoptose führen, sind zum aktuellen Zeitpunkt nicht vollständig aufgeklärt.

Zu welchem Anteil könnte mGR-vermittelte Apoptose an der glucocorticoid-induzierten Apoptose humaner PBMC beteiligt sein? Bartholome et al. konnte zeigen, dass unter physiologischen Bedingungen bis zu 9,2 % der Monozyten und bis zu 12,3 % der B-Lymphozyten, aber keine T-Lymphozyten mGR-positiv waren. Unter Stimulation mit LPS stieg die Anzahl mGR-positiver Monozyten auf durchschnittlich 33,8 % stark an, nicht aber die mGR-Expression der Lymphozytenpopulationen. In den vorliegenden Untersuchungen kann von einem Anteil mGR-vermittelter, nichtgenomischer Mechanismen der glucocorticoid-induzierten Apoptose ausgegangen werden. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen lässt sich aber keine eindeutige Aussage über den Anteil dieser nichtgenomisch vermittelten Glucocorticoideffekte im Vergleich zur cGR-vermittelten Apoptose treffen.

Abbildung 42 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die unterschiedlichen Wirkstärken der Glucocorticoide und von Myxothiazol. Myxothiazol wurde analog zu den Untersuchungen des Sauerstoffverbrauchs humaner PBMC in den Konzentrationen IC₂₅ und IC₅₀ mitgeführt.

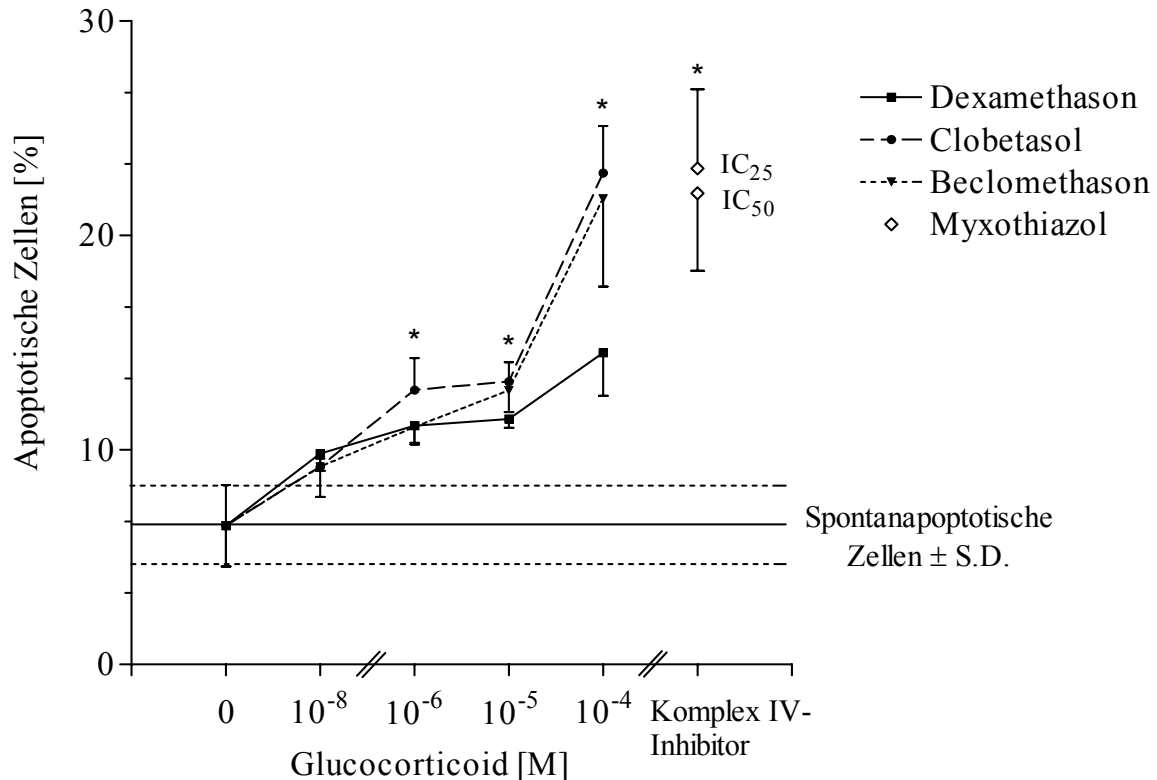


Abb. 42: Einfluss verschiedener Konzentrationen von Dexamethason, Clobetasol und Beclomethason sowie Myxothiazol auf die Apoptose humaner PBMC. Angegeben sind der Mittelwert und der S.E.M. * signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert ($p < 0,05$).

4.2.4 Nichtgenomische und genomische Potenzen für Clobetasol und Beclomethason im Vergleich zu Dexamethason und klinische Relevanz

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben den gut untersuchten genomischen Mechanismen auch nichtgenomische Mechanismen für die Wirksamkeit topisch angewandter Glucocorticoide verantwortlich sind. Dabei ist hervorzuheben, dass sich die topischen Glucocorticoide hinsichtlich ihrer Effektivität nichtgenomischer und genomischer Effekte deutlich von Dexamethason unterscheiden. Um eine 15%ige Hemmung des Sauerstoffverbrauchs (IC_{15}) Con A-stimulierter PBMC hervorzurufen, bedarf es nur minimaler Konzentrationen der topischen Glucocorticoide ($< 10^{-10}$ M für Clobetasol und 10^{-9} M für Beclomethason), während für Dexamethason eine Konzentration von 2×10^{-6} M benötigt wird, um

den gleichen Effekt auszulösen (siehe Tab. 2). Bezüglich der genomisch vermittelten Effekte erreichen Clobetasol und Beclomethason bereits in einer Konzentration $< 10^{-10}$ M bzw. von 10^{-10} M einen Effekt (50%ige Hemmung der stimulierten IL-6-Synthese, IC_{50}), für den Dexamethason in einer Konzentration von 3×10^{-8} M erforderlich ist. Diese Äquivalenzdosen lassen aber aufgrund der unterschiedlichen Kinetiken der topischen Glucocorticoide im Vergleich zu Dexamethason nur einen begrenzten Vergleich der Effektivitäten der einzelnen Glucocorticoide zu. Daher war es notwendig, für die topischen Glucocorticoiden eine den einzelnen Konzentrationen zugeordnete relative glucocorticoide Potenz im Vergleich zu Dexamethason zu erstellen. Dabei wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Werte auf Dexamethason = 1,0 innerhalb des entsprechenden Konzentrationsbereiches normiert.

Tab. 2: Unspezifisch nichtgenomische und genomische relative glucocorticoide Potenzen der topischen Glucocorticoide, normiert auf Dexamethason = 1,0.

	Nichtgenomisch unspezifische Effekte					Genomische Effekte				
	IC_{15}	Relative Potenz (Dexamethason=1)				IC_{50}	Relative Potenz (Dexamethason=1)			
		10^{-10} M	10^{-8} M	10^{-6} M	10^{-4} M		10^{-10} M	10^{-8} M	10^{-6} M	10^{-4} M
Dexamethason	2×10^{-6} M	1	1	1	1	3×10^{-8} M	1	1	1	1
Clobetasol	$< 10^{-10}$ M	1,4	1,4	1,3	0,7	$< 10^{-10}$ M	11,2	2,1	1,0	0,9
Beclomethason	10^{-9} M	1,1	1,1	1,1	0,5	10^{-10} M	7,0	1,8	0,9	0,8

Aus dem Vergleich der nichtgenomischen und genomischen relativen Potenzen der topischen Glucocorticoide und Dexamethason lassen sich einige klinische Beobachtungen erklären. So wird beispielsweise Dexamethason trotz seiner ausgeprägten suppressiven Wirkungen auf den hypothalamisch-hypophysären-adrenalen Regelkreis in sehr hohen Dosen bei Traumen im Bereich des zentralen Nervensystems, die mit der Entwicklung von Ödemen einhergehen, therapeutisch eingesetzt. Die deutlichen nichtgenomisch unspezifischen Effekte in sehr hohen Konzentrationen wirken über einen membranstabilisierenden Effekt und über den Schutz vor

Lipidoxidation durch freie Radikale der Entwicklung eines posttraumatischen Hirn- oder Rückenmarködems entgegen. Die beiden topischen Glucocorticoide zeigen ebenfalls deutliche nichtgenomisch unspezifische Wirkungen, die schon bei sehr niedrigen Konzentrationen eine maximale Wirkung zeigen. Beclomethason wird vor allem zur Behandlung des Asthma bronchiale eingesetzt, wo seine unspezifischen Effekte vor allem der Membranstabilisierung dient. Auch Dexamethason kommt bei der Therapie von Atemwegserkrankungen zum Einsatz. Mygind et al. beschrieben aber, dass die Anwendung von Dexamethason in der Behandlung der allergischen Rhinitis mit starken Nebenwirkungen verbunden war, die durch Beclomethason in äquivalenten Dosierungen nicht hervorgerufen wurden. Es waren relativ hohe Dosen von Dexamethason erforderlich, um einen vergleichbaren therapeutischen Effekt hervorzurufen ([Mygind et al. 1996](#)). Diese Beobachtung lässt sich mit der in der vorliegenden Arbeit gefundenen nichtgenomischen und genomischen Effektivität der topischen Glucocorticoide gegenüber Dexamethason erklären.

Um Nebenwirkungen der Glucocorticoidtherapie zu minimieren, bedarf es der Optimierung des „drug design“ synthetischer Glucocorticoide. Die Veresterung des C-Atoms an Position 17 α , wie es bei den untersuchten topischen Glucocorticoiden der Fall ist, scheint eine Lösung zur Erhöhung der Nutzen-Risiko-Ratio systemisch eingesetzter Glucocorticoide darzustellen. Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass die repräsentativ ausgewählten topischen Glucocorticoide Clobetasol und Beclomethason sowohl bei nichtgenomisch als auch bei genomisch vermittelten Effekten bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen maximale Effekte erzielten, die durch Dexamethason erst in hohen bis sehr hohen Dosen zu erreichen waren. Für die klinische Anwendung könnte das bedeuten, dass unter Verwendung systemischer Glucocorticoide, deren chemische Struktur in wesentlichen Details an die Struktur topischer Glucocorticoide angelehnt ist, eine bedeutend geringere Dosierungen zum Erreichen des gleichen therapeutischen Effekts mit einem entsprechend geringer ausgeprägten Nebenwirkungsprofil nötig wäre. Die Apoptose verschiedener Gewebe und Zellen stellt eine häufig auftretende Nebenwirkung von Glucocorticoidtherapien dar. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, werden maximale nichtgenomische und genomische Effekte durch topische Glucocorticoide bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen erreicht, bei denen die Effekte auf die Induktion von Apoptose gering sind und sich von Dexamethason nicht unterscheiden. Durch die Kinetik des lymphozytären Zelltodes nach Zugabe der topischen Glucocorticoide wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit ein weiterer Vorteil topischer Glucocorticoide gegenüber Dexamethason deutlich. Bereits mittlere Konzentrationen der topischen Glucocorticoide

erreichen annähernd die Wirkstärke sehr hoher Konzentrationen von Dexamethason. In sehr hohen Konzentrationen übertreffen die topischen Glucocorticoide deutlich die apoptose-induzierende Wirkung von Dexamethason. In klinischen Situationen, in denen die Apoptose lymphozytärer Zellen erwünscht ist, beispielsweise bei der Behandlung akuter Exazerbationen autoimmunologischer Erkrankungen, zeigen die topischen Glucocorticoide eine deutlich stärkere Potenz als Dexamethason. Damit wäre ein differenzierterer Einsatz von Glucocorticoiden zur Behandlung akuter Schübe autoimmunologischer Erkrankungen möglich. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Clobetasol und Beclomethason eine bessere Nutzen-Risiko-Ratio zeigten und die chemisch-strukturellen Eigenschaften der topischen Glucocorticoide von Interesse für das drug design systemischer Glucocorticoide und somit von klinischem Nutzen sein können.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, erstmals ein nach den modularen Wirkmechanismen differenziertes Wirkprofil topischer Glucocorticoide in humanen PBMC zu erstellen und mit Dexamethason als systemische Referenzsubstanz zu vergleichen. Dazu wurde erstens die Beeinflussbarkeit des zellulären Energiestoffwechsels ruhender und mitogen stimulierter PBMC durch die Glucocorticoide mittels einer Clark-Elektrode bestimmt. Die Effekte auf den Sauerstoffverbrauch als einen Parameter des zellulären Energiestoffwechsels sind unspezifisch nichtgenomisch vermittelt. Des Weiteren wurden genomisch vermittelten Glucocorticoideffekte auf die Interleukinsynthese ruhender und mitogen stimulierter PBMC mittels eines nichtkompetitiver enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) quantifiziert. Schließlich wurde die glucocorticoid-induzierte Apoptose als trimodular vermittelter Prozess durchflusszytometrisch mittels Annexin V- und DNA-Färbung bestimmt.

Es wurde erstmalig der Einfluss topischer Glucocorticoiden auf den zellulären Energiestoffwechsel untersucht. Als wesentliche Unterschiede zu Dexamethason stellte sich heraus, dass Clobetasol und Beclomethason den Sauerstoffverbrauch sowohl in ruhenden als auch in stimulierten Zellen bereits in sehr niedrigen Konzentration von 10^{-10} M maximal und konzentrationsunabhängig hemmten. Dexamethason hemmte den Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der Konzentration mit einem Maximum bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10^{-4} M. Die topischen Glucocorticoide zeigten bezüglich des zellulären Energiestoffwechsels bei sehr niedrigen Konzentrationen eine stärkere nichtgenomische Potenz.

Die topischen Glucocorticoide zeigten eine deutliche, inhibierende Wirkung auf die Interleukin-6-Synthese stimulierter PBMC. Bereits in der sehr niedrigen Konzentration von 10^{-10} M bzw. 10^{-8} M führten Clobetasol und Beclomethason zu einer signifikanten und maximalen Hemmung der genomisch vermittelten Effekte. Auch hier wurde keine Konzentrationsabhängigkeit gefunden. Im Gegensatz dazu zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Effekt von Dexamethason mit einer im Vergleich zu den topischen Glucocorticoiden äquivalenten Effektivität ab einer Konzentration von 10^{-6} M. Auch in Bezug auf genomisch vermittelte Effekte zeigten die topischen Glucocorticoide bei niedrigen Konzentrationen eine deutlich stärkere Potenz.

Die Untersuchungen zum Einfluss der Glucocorticoide auf die Apoptose von PBMC konnten zeigen, dass es sowohl nach Inkubation mit Dexamethason als auch mit den topischen Glucocorticoiden zu einer Induktion von Apoptose in Abhängigkeit von der Konzentration kam. Im Unterschied zu den vorangegangenen Ergebnissen unterschieden sich dabei die topischen Glucocorticoide im Bereich niedriger Konzentrationen nicht von Dexamethason. Sie führten aber in sehr hohen Konzentrationen zu einer signifikant deutlicheren Apoptoseinduktion.

Die Wirkpotenzen von Clobetasol und Beclomethason unterschieden sich kaum für genomisch und nichtgenomisch vermittelte Effekte. Hinsichtlich der relativen Potenzen der topischen Glucocorticoide im Vergleich zu Dexamethason zeigte sich aber ein deutlicher Unterschied in Abhängigkeit von der Konzentration und vom Wirkmechanismus.

Das von Buttgeriet et al. entwickelte Konzept der modularen Glucocorticoidwirkung beruht auf der Unterscheidung von genomischen sowie von spezifisch und unspezifisch nichtgenomischen zellulären Effekten auf molekularer Ebene. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass topische Glucocorticoide ihre Wirkung sowohl über genomische als auch nichtgenomische Mechanismen erzielen. Dabei vermitteln sie ihre Effekte unspezifisch nichtgenomisch und genomisch im Gegensatz zu Dexamethason bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen maximal und zeigen im Vergleich zu Dexamethason eine bessere Nutzen-Risiko-Ratio.

D-Ring-Substituenten sind offensichtlich für das Ausmaß der Modulation von Rezeptorbindung, transkriptioneller Potenz und Nutzen/Risiko-Ratio von entscheidender Bedeutung. Dabei besitzen Veresterungen und vor allem die Estergruppe des C-Atoms in Position 17 α des Steroidgerüsts einen entscheidenden Vorteil hinsichtlich Lipophilie und Rezeptorbindungsaffinität, was ihre Nutzen/Risiko-Ratio unter experimentellen Bedingungen und im klinischen Alltag deutlich verbessert. Die chemisch-strukturellen Eigenschaften der topischen Glucocorticoide können von Interesse für das drug design systemischer Glucocorticoide und somit von klinischem Nutzen sein.

Literaturverzeichnis

- 1 Adcock IM, Caramori G. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol.* 2001; 79(4): 376-84
- 2 Adcock IM. Molecular mechanisms of glucocorticoid actions. *Pulm Pharmacol Ther.* 2000; 13(3): 115-26
- 3 Adcock IM, Gilbey T, Gelder CM, Chung KF, Barnes PJ. Glucocorticoid receptor localization in normal and asthmatic lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154(3 Pt 1): 771-82
- 4 Adcock IM, Brown CR, Gelder CM, Shirasaki H, Peters MJ, Barnes PJ. Effects of glucocorticoids on transcription factor activation in human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Physiol.* 1995; 268: C331-8
- 5 Almawi WY, Tamim H. Posttranscriptional mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: glucocorticoids inhibit IL-6-induced proliferation of B9 hybridoma cells. *Cell Transplant.* 2001; 10(2): 161-4
- 6 Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science.* 1995; 270(5234): 286-90
- 7 Bamberger CM, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor and RU 486 in man. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 761: 296-310
- 8 Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid actions in humans. *J Clin Invest.* 1995; 95(6): 2435-41
- 9 Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond).* 1998; 94(6): 557-72
- 10 Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgerit F. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.* 2004; 18(1): 70-80
- 11 Beato M, Chavez S, Truss M. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids.* 1996; 61(4): 240-51
- 12 Bennett MC, Mlady GW, Fleshner M, Rose GM. Synergy between chronic corticosterone and sodium azide treatments in producing a spatial learning deficit and inhibiting cytochrome oxidase activity. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93(3): 1330-4
- 13 Berki T, Kumanovicz G, Kumanovicz A, Falus A, Ujhelyi E, Nemeth P. Production and flowcytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor-antibody. *J Immunol Methods.* 1998; 214(1-2): 19-27

- 14 Bernauer S, Wehling M, Gerdes D, Falkenstein E. The human membrane progesterone receptor gene: genomic structure and promoter analysis. . DNA Seq. 2001; 12(1): 13-25
- 15 Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, Consler TG, Parks DJ, Stewart EL, Willson TM, Lambert MH, Moore JT, Pearce KH, Xu HE. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. Cell. 2002; 110(1): 93-105
- 16 Borski RJ, Hyde GN, Fruchtmann S. Signal transduction mechanisms mediating rapid, nongenomic effects of cortisol on prolactin release. Steroids. 2002; 67(6): 539-48
- 17 Borski RJ. Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. Trends Endocrinol Metab. 2000; 11(19): 427-36
- 18 Borski RJ, Helms LM, Richman NH, Grau EG. Cortisol rapidly reduces prolactin release and cAMP and Ca²⁺ accumulation in the cichlid fish pituitary in vitro. Proc Natl Acad Sci. 1991; 88(7): 2758-62
- 19 Borsook H, Jiggins S, Wilson RT. Two inducers of rapid erythroblast multiplication in vitro. Nature. 1971; 230: 328-30
- 20 Boumpas DT. A novel action of glucocorticoids--NF-kappa B inhibition. . Br J Rheumatol. 1996; 35(8): 709-10
- 21 Bøyum A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood: General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1968; 97: 51-76
- 22 Bøyum A. Separation of white blood cells. Nature. 1964; 204: 793-94
- 23 Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin TS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon J, Marshall LF, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury. 1-year follow-up data. J Neurosurg. 1992; 76: 2-31
- 24 Brazzini B, Pimpinelli N. New and established topical corticosteroids in dermatology: clinical pharmacology and therapeutical use. Am J Clin Dermatol. 2002; 3(1): 47-58
- 25 Brown GC. Control of respiration and ATP-synthesis in mammalian mitochondria and cells. J Biochem. 1992; 284: 1-13
- 26 Brusaferri F, Candlise L. Steroids for multiple sclerosis and optic neuritis. A meta-analysis of randomized controlled clinical trials. J Neurol. 2000; 247(6): 435-42
- 27 Buck C, Bundschu J, Gallati H, Bartmann P, Pohlandt F. Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. Pediatrics. 1994; 93(1): 54-8
- 28 Buttgereit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immun cells. Steroids. 2002; 67: 529-34
- 29 Buttgereit F, da Silva JA, Boers M, Burmester GR, Cutolo M, Jacobs J, Kirwan J, Kohler L, van Riel P, Vischer T, Bijlsma JW. Standardised nomenclature of glucocorticoid dosages and glucocorticoid

- treatment regimes: current questions and tentative answers in rheumatology. *Ann Rheum Diss.* 2002; 61(8): 718-22
- 30 Buttgereit F, Burmester GR, Brand MD. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunol Today.* 2000; 21: 192-9
 - 31 Buttgereit F, Brand MD, Burmester GR. Equivalent doses and relative drug potencies for nongenomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. *Biochem pharmacol.* 1999; 58: 363-8
 - 32 Buttgereit F, Wehling M, Burmester GR. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions. *Arthritis Rheum.* 1998; 41(5): 761-7
 - 33 Buttgereit F, Krauss S, Brand MD. Methylprednisolone inhibits uptake of Ca^{2+} and Na^{+} ions into Con A stimulated thymocytes. *J Biochem.* 1997; 326: 329-32
 - 34 Buttgereit F, Dimmeler S, Neugebauer E, Burmester GR. Wirkungsmechanismen der hochdosierten Glucocorticoidtherapie. *Dtsch Med Wschr.* 1996; 121: 248-52
 - 35 Buttgereit F, Brand MD. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *J Biochem.* 1995; 312: 163-7
 - 36 Buttgereit F, Brink I, Thiele B, Burmester GR, Hiepe F, Hall ED. Effects of methylprednisolone and 21-aminosteroids on mitogen-induced interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 275(2): 850-3
 - 37 Buttgereit F, Grant A, Müller M, Brand MD. The effects of methylprednisolone on oxidative phosphorylation in Con A-stimulated thymocytes: top down elasticity analysis and control analysis. *Eur J Biochem.* 1994; 223: 513-19
 - 38 Buttgereit F, Brand MD, Müller M. Effects of methylprednisolone on the energy metabolism of quiescent and Con A-stimulated thymocytes of the rat. *Biosci Rep.* 1993; 13: 41-52
 - 39 Buttgereit F, Brand MD, Müller M. Con A induced changes in energy metabolism of rat thymocytes. *Biosci Rep.* 1992; 12: 381-6
 - 40 Buttgereit F, Müller M, Rapoport SM. Quantification of ATP-producing and consuming processes in quiescent pig spleen lymphocytes. *Biochem Int.* 1991; 42: 59-67
 - 41 Cato AC, Nestl A, Mink S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signalling pathways. *Sci STKE.* 2002; 138: 9
 - 42 Chen D, Kohli K, Zhang S, Danielsen M, Stallcup MR. Phenylalanine-780 near the C-terminus of the mouse glucocorticoid receptor is important for ligand binding affinity and specificity. *Mol Endocrinol.* 1994; 8: 422-30
 - 43 Chen F, Watson CF, Gametchu B. Multiple glucocorticoid receptor transcripts in membrane glucocorticoid receptor enriched S-49 mouse lymphoma cells. *J Cell Biochem.* 1999; 74(3): 418-29
 - 44 Chen F, Watson CF, Gametchu B. Association of the glucocorticoid receptor alternatively-spliced transcript 1A with the presence of the high molecular weight membrane glucocorticoid receptor in

- mouse lymphoma cells. *J Cell Biochem.* 1999; 74(3): 430-46
- 45 Cifone MG, Migliorati G, Parroni R, Marchetti C, Millimaggi D, Santoni A, Riccardi C. Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinositide-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase, and caspases. *Blood.* 1999; 93(7): 2282-96
- 46 Clark LC. U.S. Patent No 2913 386. USA, 1959,
- 47 Croxtall JD, van Hal PTW, Choudhury Q, Gilroy DW, Flower RJ. Different glucocorticoids vary in their genomic and non-genomic mechanism of action in A549 cells. *Br J Pharmacol.* 2002; 135(2): 511-9
- 48 Croxtall JD, Chudhury Q, Flowers RJ. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor dependent, transcription independent mechanism. *Br J Pharm.* 2000; 130(2): 289-98
- 49 Da Silva JAP, Bijlsma JWJ. Optimizing glucocorticoid therapy in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin N Am.* 2000; 26: 859-80
- 50 Dahlberg E, Thalen A, Brattsand R, Gustafsson JA, Johansson U, Roempke K, Saartok T. Correlation between chemical structure, receptor binding, and biological activity of some novel, highly active, 16 alpha, 17 alpha-acetal-substituted glucocorticoids. *Mol Pharmacol.* 1984; 25(1): 70-8
- 51 Dallaporta B, Marchetti P, de Pablo MA, Maisse C, Duc HT, Metivier D, Zamzami N, Geuskens M, Kroemer G. Plasma membrane potential in thymocyte apoptosis. *J Immunol.* 1999; 162(11): 6534-42
- 52 Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry.* 1992; 13(8): 795-808
- 53 DeRijk RH, Schaaf M, de Kloet ER. Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002; 81(2): 103-22
- 54 Diba F, Watson CS, Gametchu B. 5'UTR sequences of the glucocorticoid receptor encode a peptide associated with translational regulation of the glucocorticoid receptor. *J Cell Biochem.* 2001; 81(1): 149-61
- 55 Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol.* 2002; 39: 531-6
- 56 Diem R, Hobom M, Maier K, Weissert R, Storch MK, Meyer R, Baehr M. Methylprednisolone increases neuronal apoptosis during autoimmune CNS inflammation by inhibition of an endogenous neuroprotective pathway. *J Neurosci.* 2003; 23(18): 6993-7000
- 57 Distelhorst CW. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Diff.* 2002; 9: 6-19
- 58 Distelhorst W, Dubyak G. Role of calcium in glucocorticosteroid-induced apoptosis of thymocytes and lymphoma cells: resurrection of old theories by new findings. *Blood.* 1998; 91: 731-4.
- 59 Eagle H. Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. *Proc Soc Exp*

- Biol Med. 1955; 89(3): 362-4
- 60 Encio IJ, Detera-Wadleigh SD. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* 1991; 266(11): 7182-8
- 61 Evans SJ, Moore FL, Murray TF. Solubilization and pharmacological characterization of a glucocorticoid membrane receptor from an amphibian brain. *J Steroid Biochem.* 1998; 67(1): 1-8
- 62 Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feurig M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones – a focus on rapid nongenomic effects. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(4): 513-56
- 64 Falkenstein E, Meyer C, Eisen C, Scriba PC, Wehling M. Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 229(1): 86-9
- 64 Ferrari P. Cortisol and the renal handling of electrolytes: role in glucocorticoid-induced hypertension and bone disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003; 17(4): 575-89
- 65 Gametchu B, Watson CS. Correlation of membrane glucocorticoid receptor levels with glucocorticoid-induced apoptotic competence using mutant leukemic and lymphoma cells lines. *J Cell Biochem.* 2002; 87(2): 133-46
- 66 Gametchu B, Chen F, Sackey F, Powell C, Watson CS. Plasma membrane resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids.* 1999; 64: 107-19
- 67 Gametchu B, Watson CS, WU S. Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients. *FASEB.* 1993; 7(13): 1283-92
- 68 Gametchu B. Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: correlation to cell lysis. *Science.* 1987; 236(4800): 456-61
- 69 Gametchu B, Harrison RW. Characterization of a monoclonal antibody to the rat liver glucocorticoid receptor. *Endocrinology.* 1984; 114(1): 274-9
- 70 Giacomelli R, Cipriani P, Danese C, Pizzuto F, Lattanzio R, Parzanese I, Passacantando A, Perego MA, Tonietti G. Peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic sclerosis produce increased amounts of interleukin 6, but not transforming growth factor beta 1. *J Rheumatol.* 1996; 23(2): 291-6
- 71 Gold R, Buttgereit F, Toyka KV. Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders. *J Neuroimmunol.* 2001; 117(1-2): 1-8
- 72 Goulding NJ, Guyre PM. Glucocorticoids, lipocortins and the immune response. *Curr Opin Immunol.* 1993; 5(1): 108-13
- 73 Greiner EF, Guppy M, Brand K. Glucose is essential for proliferation and the glycolytic enzyme induction that provokes a transition to glycolytic energy production. *J Biol Chem.* 1994; 269(50): 31484-90
- 74 Griffiths CE. Keeping psoriasis under wraps. *J Dermatolog Treat.* 2001; 12(3): 133
- 75 Groner B, Hynes NE, Rahmsdorf U, Ponta H. Transcription initiation of transfected mouse mammary

- tumor virus LTR DNA is regulated by glucocorticoid hormones. *Nucleic Acids Res.* 1983; 11(14): 4713-25
- 76 Grove A, Allam C, McFarlane LC, McPhate G, Jackson CM, Lipworth BJ. A comparison of the systemic bioactivity of inhaled budesonide and fluticasone propionate in normal subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 1994; 38(6): 527-32
- 77 Guppy M, Greiner E, Brand K. The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. *Eur J Biochem.* 1993; 212(1): 95-9
- 78 Gysler A, Kleuser B, Sippl W, Lange K, Korting HC, Hölzle HD, Korting HC. Skin penetration and metabolism of topical glucocorticoids in reconstructed epidermis and in excised human skin. *Pharm Res.* 1999. 16(9); 1386-91
- 79 Hall ED. Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: how do we build on past success. *J Spinal Cord Med.* 2001; 24(3): 142-6
- 80 Hall ED, McCall JM, Means ED. Therapeutic potential of lizaroids (21-aminosteroids) in acute central nervous system trauma, ischemia and subarachnoid hemorrhage. *Advanc Pharmacol.* 1994; 28: 221-68
- 81 Hammer S, Spika I, Sippl W, Jessen G, Kleuser B, Hölzle HD, Schäfer-Korting M. Glucocorticoid receptor interactions with glucocorticoids: evaluation by molecular modeling and functional analysis of glucocorticoid receptor mutants. *Steroids.* 2003; 68: 329-39
- 82 Hatz HJ. Glucocorticoide - immunologische Grundlagen, Pharmakologie und Therapierichtlinien. Band Hatz HJ. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1998,
- 83 Helmberg A, Auphan N, Caelles C, Karin M. Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 1995; 14(3): 452-60
- 84 Hench PS, Kendall PD, Slocumb CH, Polley HF. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: Compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc Staff Meet Mayo Clin.* 1949; 24: 183
- 85 Herrlich P. Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. *Oncogene.* 2001; 20(19): 2465-75
- 86 Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today.* 1990; 11(12): 443-9
- 87 Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature.* 1985; 318(6047): 635-41
- 88 Hofmann TG, Hehner SP, Bacher S, Droge W, Schmitz ML. Various glucocorticoids differ in their ability to induce gene expression, apoptosis and to repress NF-kappaB-dependent transcription. *FEBS Lett.* 1998; 441(3): 441-6
- 89 Hulkko SM, Wakui H, Zilliacus J. The pro-apoptotic protein death-associated protein 3 (DAP3)

- interacts with the glucocorticoid receptor and affects the receptor function. *Biochem J.* 2000; 349 Pt 3: 885-93
- 90 Hummel M, Czerlinski S, Friedel N, Liebenthal C, Hasper D, von Baehr R, Hetzer R, Volk HD. Interleukin-6 and interleukin-8 concentrations as predictors of outcome in ventricular assist device patients before heart transplantation. *Crit Care Med.* 1994; 22(3): 448-54
- 91 Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 β -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(18):: 6891-903
- 92 Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem.* 1993; 268(15): 10932-7
- 93 Janeway CA, Travers P. *Immunology.* Second edition, Heidelberg-Berlin-Oxford, Spektrum Akademischer Verlag, 1997, 56-64
- 94 Kaiser H, Klingenberg N. Cortison – die Geschichte eines Medikaments. Darmstadt, Wiss. Buchges.,, 1988,
- 95 Kaiser H. Hochdosierte Corticoidtherapie. *Int. Praxis.* 1991; 151:
- 96 Kaiser H, Kley HK. Cortisontherapie. 10. Auflage, Stuttgart-New York, Georg Thieme Verlag, 1997,
- 97 Karin M. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable?. *Cell.* 1998; 93(4): 487-90
- 98 Karlsson H, De Pierre JW, Nassberger L. Energy levels in resting and mitogen-stimulated human lymphocytes during treatment with FK506 or cyclosporine in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1319: 301-10
- 99 Kemeny DM, Challacombe SJ. Microtiter plates and other solid-phase supports. ELISA and other solid-phase immunoassays. Theoretical and practical aspects. Chichester, UK, John Wiley and sons Ltd, 1994
- 100 King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 1998; 60: 601-17
- 101 Kirwan JR. Systemic low-dose glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2001; 27(2): 389-403
- 102 Klippel JH. Systemic lupus erythematoses. Management. Hrsg.: Klippel JH, Dieppe PH: *Rheumatology.* 2nd edition, London, Mosby, 1998, 1-8
- 103 Koukouritaki SB, Margioris AN, Gravanis A, Hartig R, Stournaras C. Dexamethasone induces rapid actin assembly in human endometrial cells without affecting its synthesis. *J Cell Biochem.* 1997; 65(4): 492-500
- 104 Krauss S, Buttgeriet F, Brand MD. Effects of the mitogen concanavalin A on pathways of thymocyte energy metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1412(2): 129-38
- 105 Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today.* 1997; 18(1): 44-51

- 106 Kuhnke A, Burmester GR, Krauss S, Buttgerit F. Bioenergetics of immune cells to assess rheumatic disease activity and efficacy of glucocorticoid treatment. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62: 133-9
- 107 Lamche HR, Silberstein PT, Knabe AC, Thomas DD, Jacob HS, Hammerschmidt DE. Steroids decrease granulocyte membrane fluidity, while phobol ester increases membrane fluidity. *Inflammation*. 1990; 14: 61-70
- 108 Langford CA. Management of systemic vasculitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2001; 15: 281-97
- 109 Leist M. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*. 1997; 185: 1481-6
- 110 Leussink VI, Jung S, Merschdorf U, Toyka KV, Gold R. High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch Neurol*. 2001; 58(1): 91-7
- 111 Levin ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids*. 2002; 67(6): 471-5
- 112 Levine SJ, Benfield T, Shelhamer JH.. Corticosteroids induce intracellular interleukin-1 receptor antagonist type I expression by a human airway epithelial cell line. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996; 15(2): 245-51
- 113 Li C, Dasgupta B.. Corticosteroids in polymyalgia rheumatica. A review of different treatment schedules. *Clin Exp Rheum*. 2000; 18(Suppl 20): 56-7
- 114 Liddell E, Weeks I. *Antikörpertechniken*. Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag, 1995,
- 115 Lipworth BJ. Clinical pharmacology of corticosteroids in bronchial asthma. *Pharmacol Ther*. 1993; 58: 173-209
- 116 Lösel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Mol Cell Biol*. 2003; 4: 46-56
- 117 Lozewicz S, Wang J, Duddle J, Thomas K, Chalstrey S, Reilly G. Topical glucocorticoids inhibit activation by allergen in the upper respiratory tract. *J Allergy Clin Immunol*. 1992; 89: 951-7
- 118 Luconi M, Bonaccorsi L, Bini L, Liberatori S, Pallini V, Forti G. Characterization of membrane nongenomic receptors for progesterone in human spermatozoa. *Steroids*. 2002; 67(6): 505-9
- 119 Marchetti MC, Di Marco B, Cifone G, Migliorati G, Riccardi C. Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes: role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation. *Blood*. 2003; 101(2): 585-93
- 120 Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, Haeflner A, Hirsch F, Geuskens M, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med*. 1996; 184(3): 1155-60
- 121 Masera RG, Dovo A, Sartori ML, Racca S, Angeli A. Interleukin-6 upregulates glucocorticoid receptor numbers in human osteoblast-like cells. *Z Rheumatol*. 2000; 59(2): 102-7
- 122 Masuyama K, Jacobson MR, Rak S, Meng Q, Sudderick RM, Kay AB. Topical glucocorticoid inhibits cell expressing mRNA for interleukin 4 in the nasal mucosa in allergen induced rhinitis.

- Immunology. 1994; 82: 192-9
- 123 Meinig G, Deisenroth K. Dose-response relation for dexamethasone in cold lesion-induced brain edema in rats. *Adv Neurol.* 1990; 52: 295-300
 - 124 Migita K, Eguchi K, Kawabe Y, Nakamura T, Shirabe S, Tsukada T, Ichinose Y, Nakamura H, Nagataki S. Apoptosis induction in human peripheral blood T lymphocytes by high-dose steroid therapy. *Transplantation.* 1997; 63(4): 583-7
 - 125 Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachi A, Yonehara S, Taniguchi N. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol.* 1992; 149: 3753-8
 - 126 Morand EF. Corticosteroids in the treatment of rheumatologic diseases. *Curr Opin Rheumatol.* 2000; 12(3): 171-7
 - 127 Muller M, Siems W, Buttgerit F, Dumdey R, Rapoport SM. Quantification of ATP-producing and consuming processes of Ehrlich ascites tumour cells.. *Eur J Biochem.* 1986; 161(3): 701-5.
 - 128 Munck A, Brinck-Johnsen T.. Specific and nonspecific physicochemical interactions of glucocorticoids and related steroids with rat thymus cells in vitro. *J Biol Chem.* 1968; 243(21): 5556-65
 - 129 Mursch K, Buhre W, Behnke-Mursch J, Markakis E. Perioperative cardiovascular stability during brainstem surgery. The use of high-dose methylprednisolone compared to dexamethasone. A retrospective analysis. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2000; 44(4): 378-82
 - 130 Mygind N, Lund V. Topical corticosteroid therapy of rhinitis. *Clin Immunother.* 1996; 5: 122-36
 - 131 Navarrete MG, Brey RL. Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Treat Options Neurol.* 2000; 2(5): 473-485
 - 132 Nissen RM, Yamamoto KR. The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 2000; 14(18): 2314-29
 - 133 Norman AW, Olivera CJ, Barreto Silva FR, Bishop JE. A specific binding protein/receptor for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) is present in an intestinal caveolae membrane fraction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 298(3): 414-9
 - 134 Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor β isoform. *J Biol Chem.* 1999; 274(39): 27857-66
 - 135 Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 1993; 81(11): 2844-53
 - 136 Orchinik M, Murray TF, Moore FL. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science.* 1991; 252(5014): 1848-51
 - 137 Orchinik M, Murray TF, Franklin PH, Moore FL. Guanyl nucleotides modulate binding to steroid receptors in neuronal membranes. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89(9): 3830-4
 - 138 Patschan D, Loddenkemper K, Buttgerit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone.* 2001; 29(6): 498-505

- 139 Peters M, Müller AM, Rose-John S. Interleukin-6 and soluble Interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp 130 and hematopoiesis. *Blood*. 1998; 92(10): 3495-504
- 140 Pfister R, Menz G. Glucocorticosteroid therapy in bronchial asthma. *Pneumologie*. 1995; 49(5): 293-305
- 141 Planey SL, Litwack G. Glucocorticoid-induced apoptosis in lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 279(2): 307-12
- 142 Ponec M, Kempenaar J, Shroot B, Caron JC.. Glucocorticoids: binding affinity and lipophilicity. *J Pharm Sci*. 1986; 75(10): 973-5
- 143 Pörtner M, Möllmann H, Rohdewald P. Glucocorticoid receptors in human synovial tissue and relative receptor affinities of glucocorticoid-21-esters. *Pharm Res*. 1988; 5: 623-7
- 144 Pratt WB. The hsp90 based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998; 217(4): 420-34
- 145 Qiu J, Lou LG, Huang XY, Lou SJ, Pei G, Chen YZ. Nongenomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of nicotine-induced calcium-influx in PC12 cells: involvement of protein kinase C. *Endocrinology*. 1998; 139(12): 5103-8
- 146 Qiu J, Wang P, Jing Q, Zhang W, Li X, Zhong Y, Sun G, Pei G, Chen YZ. Rapid activation of ERK1/2 mitogen activated protein kinase by corticosterone in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 29(4): 1017-24
- 147 Rapoport SM, Raderecht HJ. *Physiologisch-chemisches Praktikum*. 7. Aufl., VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin, 1977, 156-9
- 148 Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol*. 1999; 13(2): 307-19
- 149 Reichardt HM, Tuckermann JP, Gottlicher M, Vujic M, Weih F, Angel P, Herrlich P, Schutz G. Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J*. 2001; 20(24): 7168-73
- 150 Reichardt HM, Tuckermann JP, Bauer A, Schutz G. Molecular genetic dissection of glucocorticoid receptor function in vivo. *Z Rheumatol*. 2000; 59 Suppl 2: 1-5
- 151 Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schutz G. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell*. 1998; 93(4): 531-41
- 152 Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev*. 1997; 77(3): 731-58
- 153 Rupprecht R, Reul JM, van Steensel B, Spengler D, Soder M, Berning B, Holsboer F, Damm K. Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. *Eur J Pharmacol*. 1993; 247(2): 145-54

- 154 Sachs L. Angewandte Statistik. 7. Aufl., Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag, 1992,
- 155 Sackey FN, Watson CS, Gametchu B. Cell cycle regulation of membrane glucocorticoid receptor in CCRF-CEM human ALL cells: correlation to apoptosis. *Am J Physiol.* 1997; 273(3 Pt 1): E571-83
- 156 Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 2000; 21(1): 55-89
- 157 Schlaghecke R, Kornely E, Wollenhaupt J, Specker C. Glucocorticoid receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992; 35(7): 740-4
- 158 Schmid BM, Gerdes D, Feuring M, Falkenstein E, Christ M, Wehling M. Rapid nongenomic steroid actions: A new age?. *Front Neuroendocrinol.* 2000; 21(1): 57-94
- 159 Schmid D, Burmester GR, Tripmacher R, Kuhnke A, Buttgereit F. Bioenergetics of human peripheral blood mononuclear cell metabolism in quiescent, activated and glucocorticoid-treated states. *Biosci Rep.* 2000; 20: 289-302
- 160 Schmidt J, Gold R, Schonrock L, Zettl UK, Hartung HP, Toyka KV. T-cell apoptosis in situ in experimental autoimmune encephalomyelitis following methylprednisolone pulse therapy. *Brain.* 2000; 123(Pt 7): 1431-41
- 161 Schulz M, Zhang R, Eggert H, Boeke J, Neeck G, Eggert M, Renkawitz R. Distinct proteins interacting with the glucocorticoid receptor. *Z Rheumatol.* 2000; 59(Suppl 2): 6-11
- 162 Seeto C, Namkung-Matthai H, Jayram S, Foe K, Brown KF, Hughes JM, Mason RS, Armour CL, Seale JP. Differential potency of beclomethasone esters in-vitro on human T-lymphocyte cytokine production and osteoblast activity. *J Pharm Pharmacol.* 2000; 52: 417-23
- 163 Seshagiri PB, Bavister BD. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the "crabtree effect". *Mol Reprod Dev.* 1991; 30(2): 105-11
- 164 Shroot B, Caron JC, Ponec M. Glucocorticoid specific binding: structure-activity relationships. *Br J Dermatol.* 1982; 107 Suppl 23: 30-4
- 165 Simon N, Jolliet P, Morin C, Zini R, Urien S, Tillement JP. Glucocorticoids decrease cytochrome c oxidase activity of isolated rat kidney mitochondria. *FEBS Lett.* 1998; 435(1): 25-8
- 166 Solito E, Mulla A, Morris JF, Christian HC, Flower RJ, Buckingham JC. Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology.* 2003; 144(4): 1164-74
- 167 Steinmetz HT, Herbertz A, Bertram M, Diehl V. Increase in interleukin-6 serum level preceding fever in granulocytopenia and correlation with death from sepsis. *J Infect Dis.* 1995; 171(1): 225-8
- 168 Sudlow AW, Carey F, Forder R, Rothwell NJ. The role of lipocortin-1 in dexamethasone-induced

- suppression of PGE2 and TNF alpha release from human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Pharmacol.* 1996; 117(7): 1449-56
- 169 Suter D, Weidemann MJ. Regulation of carbohydrate metabolism in lymphoid tissue. Nature of the endogenous substrates and their contribution to the respiratory fuel of the sliced rat spleen in vitro. *Biochem J.* 1976; 156(1): 119-27
- 170 Trampisch HJ, Windeler J, Ehle B, Lange S. *Medizinische Statistik.* Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag, 1997,
- 171 Tyrrell JB. Glucocorticoid therapy. Hrsg.: Felig P, Baxter JD, Frohman LA: *Endocrinology and metabolism.* 3rd edition, New York, McGraw-Hill, Inc., 1995, 855-82
- 172 Umland SP, Schleimer RP, Johnston SL. Review of the molecular and cellular mechanisms of action of glucocorticoids for use in asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2002; 15(1): 35-50
- 173 Vanden Berghe W, Francesconi E, De Bosscher K, Resche-Rigon M, Haegeman G. Dissociated glucocorticoids with anti-inflammatory potential repress interleukin-6 gene expression by a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism. *Mol Pharmacol.* 1999; 56(4): 797-806
- 174 Volpin R, Angeli P, Galioto A, Fasolato S, Neri D, Barbazza F, Merenda R, Del Piccolo F, Strazzabosco M, Casagrande F, Feltracco P, Sticca A, Merkel C, Gerunda G, Gatta A. Comparison between two high-dose methylprednisolone schedules in the treatment of acute hepatic cellular rejection in liver transplant recipients: a controlled clinical trial. *Liver Transpl.* 2002; 8(6): 527-34
- 175 Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Ann Rev Immunol.* 2002; 20: 125-63
- 176 Wehling M. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol.* 1997; 59: 365-93
- 177 Westgard JO. A multi-rule chart for quality control. *Clin Chem.* 1981; 27: 493-501
- 178 Whelan CJ, Payne AN, Planquois JM. A comparison of the inhibitory effects of budesonide, beclomethasone dipropionate, dexamethasone, hydrocortisone and tixocortol pivalate on cytokine release from leukocytes recovered from human bronchoalveolar lavage. *Inflamm Res.* 1999; 48: 224-8
- 179 Wolff ME, Baxter JD, Kollman PA, Kuntz ID, Bloom E, Matulich DT, Morris J. Nature of steroid-glucocorticoid receptor interactions: thermodynamic analysis of the binding reaction. *Biochemistry.* 1978; 17: 3201-8
- 180 Wunderlich F, Benten WP, Lieberherr M, Guo Z, Stamm O, Wehlke C, Sekeris CE, Mossmann H. Testosterone signalling in T cells and macrophages. *Steroids.* 2002; 67(6): 535-8
- 181 Würthwein G, Rohdewald P. Activation of beclomethasone dipropionate by hydrolysis to beclomethasone-17-monopropionate. *Biopharm Drug Dispos.* 1990; 11: 381-94
- 182 Yang Y, Mercep M, Ware CF, Ashwell JD. Fas and activation-induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids. *J*

Exp Med. 1995; 181: 1673-82

- 183 Yonehara S. Effects of anti-Fas antibodies on lymphocytes and other organs: preparation of original and new monoclonal antibodies and amelioration of systemic autoimmune disease. *Int Rev Immunol.* 1999; 18(4): 329-45
- 184 Yonehara S, Nishimura Y, Kishil S. Involvement of apoptosis antigen Fas in clonal deletion of human thymocytes. *Int Immunol.* 1994; 1849-56
- 185 Yoshino T, KondoE, Cao L, Takahashi K, Hayashi K, Nomura S, Agaki T. Inverse expression of bcl-2 and Fas antigen in lymphoblasts in peripheral lymphnodes and activated peripheral blood T and B lymphocytes. *Blood.* 1994; 83: 1856-61
- 186 Youssef PP, Haynes DR, Triantafillou S, Parker A, Gamble JR, Roberts-Thomson PJ, Ahern MJ, Smith MD. Effects of pulse methylprednisolone on inflammatory mediators in peripheral blood, synovial fluid, and synovial membrane in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997; 40(8):: 1400-8
- 187 Yudt MR, Cidlowski JA. The glucocorticoid receptor: coding for a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol.* 2002; 16(8): 1719-26
- 188 Yudt MR, Cidlowski JA. Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol.* 2001; 15(7): 1093-103
- 189 Zhang X, Moilanen E, Kankaanranta H. Enhancement of human eosinophil apoptosis by fluticasone propionate, budesonide, and beclomethasone. *Eur J Pharmacol.* 2000; 406: 325-32
- 190 Zempeni J, Mock DM. Mitogen-induced proliferation increases biotin uptake into human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Physiol.* 1999; 276(5 Pt 1): C1079-84

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Frank Buttgerit für die Überlassung des Themas, die engagierte Anleitung und Betreuung und sein unerschütterliches Vertrauen in das Gelingen dieser Arbeit. Er war jederzeit für mich ansprechbar und unterstützte mich immer geduldig mit seiner konstruktiven Kritik und dem Angebot einfacher Lösungen für komplizierte Fragen. Er schuf von Beginn an eine Atmosphäre des gegenseitigen Vertrauens und Respekts und ich habe vor allem seine Offenheit für neue Ideen und fruchtbare Diskussionen schätzen gelernt. Ich möchte Herrn Prof. Burmester dafür danken, dass ich in den Laboren der Medizinischen Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité Berlin wissenschaftlich arbeiten und meine ersten Erfahrungen auf dem Gebiet der immunologischen Forschung sammeln konnte. Ich möchte Matthias Spengler für den freundlichen Empfang in seinem FACS-Raum und die selbstlose Unterstützung in allen experimentellen und theoretischen Fragen zur Apoptose danken. Ich war in der glücklichen Lage, von seinem Wissen profitiert zu haben und von ihm in die Feinheiten wissenschaftlicher Arbeit und die besonderen Anforderungen eines Labors eingeführt worden zu sein. Er legte die Grundlagen für mein profundes EDV-Anwenderwissen und ist noch heute vertrauensvoller Ansprechpartner in allen Netzwerkfragen. Es wäre nicht das gleiche gewesen ohne ihn. Herrn Dr. Eugen Feist möchte ich für die Einführung in die Prinzipien des ELISA in Form einer handschriftlichen Skizzierung danken. Er ist für mich Vorbild für die erfolgreiche Vereinbarung guter wissenschaftlicher Arbeit und hohem klinischen Engagement. Unvergesslich wird die Einladung von Frau Dr. Antje Kuhnke zu dem letztendlich überzeugenden Latte macchiato im Café Orange bleiben. Genauso möchte ich Frau Dr. Manja Krause für die gemeinsam verbrachten endlosen Novembernächte im Angesicht der Clark-Elektroden danken. Die netten Gespräche unseres Trios waren auch immer Ansporn. Ganz herzlich möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern unseres Rheuma-Labors, insbesondere Frau Dr. Susanne Priem und Herrn Dr. Hausdorf für die freundliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft danken. Ich danke der Firma Glaxo-Wellcome für die Bereitstellung eines Promotionsstipendiums. Zuletzt möchte ich meinen Eltern für ihr grenzenloses Verständnis und die jahrelange Unterstützung für meine Arbeit danken. Sie legten die Grundlage für die gute Mischung aus nötigem Selbstvertrauen, Selbstkritik und dem Anspruch auf höchste Leistungen. Ich hatte die Freiheit und ihre Förderung, meinen Neigungen zu folgen und wurde dazu erzogen, an meine eigenen Fähigkeiten zu glauben. Ich hoffe, ihnen mit meiner erbrachten Leistungen etwas davon zurückgeben zu können.

Curriculum vitae

Name: Lydia Naumann
Geburtsdatum: 01.11.1974
Geburtsort: Radebeul
Nationalität: Deutsch

Ausbildung:

1993 Abitur, Gymnasium Kreuzschule Dresden

1993 – 1994 Diplôme d’Études en Langue Française, Eurocentre, Paris, Frankreich

1994 – 2002 Studium der Humanmedizin, Medizinische Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

1996 – 1997 - Austauschstudent / Erasmus–Stipendiat der Europäischen
Union, Université Louis Pasteur – Faculté de Medicine,
Strasbourg, Frankreich

1999 - Promotionsstipendiat, Klinik für Rheumatologie und Klinische
Immunologie der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

2002 - Visiting student / Clinical elective, New York University, Mount
Sinai Hospital, New York, USA

2000-2002 Grundstudium Philosophie, Philosophische Fakultät, Humboldt-
Universität Berlin

2003-2004 Ärztin im Praktikum / Forschungs-AiP, Medizinische Klinik für
Rheumatologie und Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Seit 07/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin / Assistenzärztin, Medizinische Klinik für
Rheumatologie und Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Berlin, 01.09.2004

Lydia Naumann

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt weder im ganzen noch in Auszügen eine Kopie anderer Arbeiten dar. Die von mir benutzten Hilfsmittel sowie die herangezogenen Literaturquellen sind vollständig aufgeführt.

Berlin, den 01.09.2004

Lydia Naumann